

ROGERIO BORGHI BÜHLER

Distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal humana de fetos e adultos : método histoquímico e imunoistoquímico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Bühler, Rogerio Borghi

Distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal humana de fetos e adultos : método histoquímico e imunoistoquímico / Rogerio Borghi Bühler. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia.

Área de concentração: Otorrinolaringologia.

Orientador: Luiz Ubirajara Sennes.

Descritores: 1.Colágneo tipo I 2.Colágeno tipo III 3.Versicanas 4.Cordas vocais
5.Laringe 6.Imunoistoquímica

USP/FM/SBD-345/08

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela oportunidade da vida.

A minha mãe pelo planejamento e investimento em minha educação.

Ao meu avô João pelo exemplo de vida.

A minha irmã Gisele pela amizade eterna.

A minha esposa Karina pela compreensão, companheirismo e apoio. Pelo exercício pleno do amor na figura de esposa, de amiga e de mãe.

Aos meus filhos, Bruno e Beatriz, pelo privilégio da descoberta do amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes, pela oportunidade de poder participar de um grupo tão seletivo da Otorrinolaringologia, pelo exemplo de dedicação e competência na área acadêmica e pelo incentivo no desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Domingos Hiroshi Tsuji, pela simplicidade e objetividade na abordagem de temas diversos indispensáveis ao nosso desenvolvimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Richard Voegels, pela confiança, apoio e incentivo que me conduziram ao curso de Pós-Graduação.

A Prof. Dra. Thais Mauad, Professora Associada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela “co-orientação”, paciência, competência e dedicação nos ensinamentos de sua área.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Clínica Otorrinolaringológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela competência e dedicação no gerenciamento da Clínica proporcionando condições adequadas para o desenvolvimento acadêmico e profissional de seus alunos.

Ao Dr. Luis Fernando Ferraz, médico do Departamento de Patologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela ajuda indispensável na elaboração das análises estatísticas, pelo altruísmo e amor à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, Professor Titular do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelas discussões iniciais fundamentais ao rumo do projeto.

Ao Prof. Dr. Osiris de Oliveira Camponês do Brasil, Professor Convidado da Disciplina de Otorrinolaringologia da Universidade Federal de São Paulo, pela paixão e vanguarda no exercício profissional da Laringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço despertando em mim o interesse nestas áreas.

Ao Dr. Erich Christiano Madruga de Melo, ex-Doutorando da Disciplina de Clínica Otorrinolaringológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela vanguarda da pesquisa, disponibilidade e boa vontade nas sugestões e discussões que culminaram no êxito deste estudo.

Ao Dr. André Duprat, Professor do Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, exemplo de atuação na Laringologia, pelas oportunidades e incentivo.

Ao Dr. Rui Imamura, pela disponibilidade e dedicação na orientação dos projetos de pesquisa da Clínica.

Ao Dr. Michel Cahali e Dr. Ronaldo Frizzarini pelas ponderações e sugestões no desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Chao Lung Wen, Chefe da Disciplina de Telemedicina do Departamento de Patologia Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade da utilização dos recursos gráficos deste estudo.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pasqualucci, Diretor do SVOC-USP e seus funcionários, pelo apoio na obtenção das laringes.

Ao Dr. Flávio Sakae, colega da Pós-graduação, pela amizade e troca de informações indispensáveis para a conclusão deste estudo.

Aos colegas da Pós-Graduação e residentes da Otorrinolaringologia pelo privilégio do convívio.

Aos colegas e residentes do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo pela compreensão e apoio.

A Sandra de Moraes, pela dedicação na elaboração do material histológico.

Aos funcionários técnicos e administrativos do Departamento de Patologia pela dedicação no exercício de suas funções.

As secretárias e funcionários do Departamento de Otorrinolaringologia, em especial a Marileide, Márcia e Luci, pelo auxílio em todos os momentos necessários.

À FAPESP.

“O homem pretende ser imortal, e para isso defende princípios efêmeros. Um dia, inexoravelmente, descobrirá que para ser imortal deverá defender princípios absolutos. Neste dia morrerá para a carne, efêmera, e viverá para o espírito, eterno. Será imortal.”

C. Charuri

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva D.S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus - National Library of Medicine.

SUMÁRIO

Revista Laryngoscope – Instrução para autores

Artigo publicado em Revista Indexada Internacional

Artigo a ser submetido à Revista Indexada Internacional

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	6
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Fibras colágenas	8
2.2 Proteoglicanos	9
2.3 Ultraestrutura da prega vocal humana em fetos.....	11
2.4 Ultraestrutura da prega vocal humana em adultos	13
3. MÉTODOS	21
3.1 Aspecto ético.....	22
3.2 Grupo fetal	22
3.2.1 Casuística	22
3.2.2 Isolamento da prega vocal.....	23
3.2.3 Histologia	23
3.2.3.1 Fibras colágenas	23
3.2.3.2 Proteoglicano versican	24
3.2.4 Análise morfométrica.....	25
3.2.5 Análise estatística.....	29

3.3	Grupo adulto	29
3.3.1	Casuística	29
3.2.2	Isolamento da prega vocal.....	30
3.2.3	Histologia	31
3.2.3.1	Fibras colágenas	31
3.2.3.2	Proteoglicano versican	32
3.2.4	Análise morfométrica.....	32
3.2.5	Análise estatística.....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1	Grupo fetal	35
4.2	Grupo adulto	44
5.	DISCUSSÃO	54
5.1	Grupo fetal	55
5.2	Grupo adulto	59
5.3	Considerações finais.....	62
6.	CONCLUSÕES	63
6.1	Grupo fetal	64
6.2	Grupo adulto	65
8.	REFERÊNCIAS.....	66

APÊNDICE



The Laryngoscope

Instructions for Contributors



Mission Statement and Scope

The Laryngoscope is an international peer-reviewed periodical dedicated to the advancement of patient care in otolaryngology–head and neck surgery. As such, **The Laryngoscope** publishes original articles relating to the clinical and basic science aspects of otolaryngology–head and neck surgery. **The Laryngoscope** reserves the right to exclusive publication of all accepted manuscripts, and will not consider any manuscript previously published or under review by another publication. Once accepted for review, the manuscript must not be submitted elsewhere. Unethical publishing such as plagiarism, undisclosed conflicts of interest, inappropriate authorship, and duplicate publication are forbidden. This includes publication in a non-otolaryngologic journal or in another language. In case of doubt, disclosure is essential and the editor is available for consultation. Transfer of copyright to **The Laryngoscope** is a prerequisite of publication. All authors must sign the copyright transfer form. (This does not preclude publication of abstracts in the transactions or proceedings of the various societies.)

Authors must disclose any financial relationship at the time of submission and must be updated by the authors prior to the time of publication. Information that could be perceived as potential conflict of interest must be stated, including personal relationships, interests, and affiliations over the past three years. This information includes, but is not limited to, grants or funding, employment, affiliations, patents, inventions, honoraria, consultancies, royalties, stock options/ownership, or expert testimony.

Manuscripts are subject to peer review and revision may be required as a condition of acceptance. These instructions apply to all submissions.

Manuscripts reporting original scientific investigation, both basic science and clinical reports, are encouraged to use the manuscript format described below. In addition to full-length original manuscripts, **The Laryngoscope** will consider for publication Contemporary Reviews, Scientific Reviews, Rapid Communications, Case Reports, Letters to the Editor, and “How I Do It” submissions.

Contemporary Review manuscripts should review topics of contemporary interest and importance, and ideally should address controversial issues by expressing both sides of the controversy. The review should emphasize the best evidence currently available. We especially invite collaborative efforts by authors representing different points of view.

Scientific Review manuscripts should address contemporary topics in otolaryngology–head and neck surgery that are controversial or in a state of rapid flux. The review should be comprehensive and authoritative as reflected by a contemporary bibliography. The manuscript format should conform to the format described below (see Manuscript Preparation) for original scientific manuscripts.

Rapid Communications report information of importance to otolaryngology–head and neck surgery not suitable for presentation as a full-length manuscript. Rapid

Communications should be limited to three double-spaced typewritten pages. An abstract and references are not required.

Case Reports describes encounters with one or several patients with unique or unusual clinical situations. The key to an acceptable Case Report is the identification of a clinical pearl or clinical wisdom that could benefit future patients. Case Reports should be limited to four double-spaced typewritten pages and no more than eight references. An abbreviated abstract limited to less than 100 words that captures the essential value of the Case Report should be included.

Letters to the Editor should be directed to the Editor regarding manuscripts previously published in which significant scientific controversy exists. Letters to the Editor deemed appropriate for publication will be submitted to the author(s) of the manuscript of interest comment. Letters to the Editor should be limited to three double-spaced type written pages including references.

“How I Do It” submissions report innovative solutions to clinical problems. Originality and quality of illustrations (when appropriate) are essential ingredients. “How I Do It” manuscripts should have a clear practical value and be no more than four double-spaced typewritten pages. No abstract is required.

Authorship Criteria and Responsibility

The Laryngoscope insists that all authors are truly qualified to be listed as such. Others who have contributed to the work but are not qualified to be authors should be “acknowledged” at the end of the article.

Authorship credit is based only on having made a substantial contribution to the published work by virtue of meeting all the following three criteria:

1. Conception and design of project or analysis of the manuscript data;
2. Drafting or critically revising the content of the manuscript submitted for publication, and;
3. Giving final approval of the version to be published.

All three criteria must be met for an individual to be listed as an author or co-author on a published paper.

Please note that other criteria, which do not qualify an individual for “author status,” include the following:

1. Supplying funding or other resources;
2. Collecting data (only);
3. General supervision of the research group, and;
4. Being departmental chair or division chief.

Special Approval

Manuscripts that include information obtained from human or animal research must include (in the text or an appropriate footnote) verification of the review and approval of the appropriate institutional research oversight committee for the work that is reported.

Preparation of Manuscript

Original scientific manuscripts and review articles that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review. PLEASE NOTE: if you are not listed in the system as the "Corresponding Author," the submission will not show up in your queue for approval.

Manuscript Submission

Until August 27th, 2008 Authors are to submit their manuscripts through the Web-based tracking system at <https://lscope.edmgr.com>

Starting August 27th, 2008 Authors must submit their manuscripts online through <http://mc.manuscriptcentral.com/lscope>

Manuscripts submitted online are received on the day of submission and quickly assigned to reviewers. Through individual Author Centers on this website, authors can view the status of their manuscripts as they progress through the review process. Notification of the disposition of each manuscript will be sent by E-mail to the corresponding author on the day of decision. To submit your manuscript online:

- Go to <http://mc.manuscriptcentral.com/lscope>
- Click on the "Check for Existing Account" button at the bottom of the opening page. If you do not already have an account, then create one by clicking on the "Create an Account" button. You then will be able to submit your manuscript.
- Click on "Author Center." Follow the on-screen instructions carefully. Submit the complete manuscript with text (including references), tables, and figures as separate files. You do not need to mail paper copies of your manuscript.
- At the end of a successful submission, you will see a confirmation screen with your manuscript number, and you will receive a separate E-mail confirmation of manuscript reception by the journal. If these two messages do not appear, then go into your Author Center and make sure that you have clicked on the "Submit" button or contact technical support at support@scholarone.com .

Manuscript format: The manuscript for the body of the text should not exceed **15 double-spaced** typewritten pages. (Please see above additional requirements for Rapid Communication, "How I Do It," etc.)

The elements of a full-length article should be in the following sequence: Title Page, Structured Abstract and Key Words, Text (Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion), Acknowledgment, References, Tables, and Figure Legends. Each of these elements should begin on a new page, and each page should have a short running title (see next section: Title Page).

Title pages:

- A. Title page must be submitted as a separate file on the first page of the online system. This should contain: article title (not to exceed 75 characters, including spaces).
- B. Title page must be submitted as part of your manuscript. This should contain: article title (not to exceed 75 characters, including spaces); names of authors, their degrees and affiliations (dept., institution, city, state, country); institution

where the work was done (indicate which author is in which department); a short running title of no more than 45 letters and spaces; source of financial support or funding; and a footnote indicating the author to whom correspondence, reprint requests, and proofs will be sent, with complete address (including e-mail address and postal codes) and telephone and telefax numbers. If the paper was presented at a meeting, give society name, city, state, country, and exact date meeting was held.

The title page must also include disclosure of funding received for this work from any of the following organizations: National Institutes of Health (NIH); Wellcome Trust; Howard Hughes Medical Institute (HHMI); and other(s).

Structured abstract and key words: Limit the abstract to 250 words. Do not cite references in the abstract. Limit the use of abbreviations and acronyms. Use the following subheads: Objectives/Hypothesis, Study Design (randomized, prospective, etc.), Methods, Results, and Conclusions.

Text: The text is to be divided into five sections with the following headings: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, and Conclusion. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). The introduction should be limited to two paragraphs of pertinent information. The discussion should not be an exhaustive review of the literature; it should be succinct and limited to conclusions that can be reached based on the results.

Abbreviations: Use generic names for drugs. List supplier of manufacturer for products and instruments; include supplier's city and state (e.g., Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC). Audiograms must be plotted according to ISO standards and must be in black and white. For commonly accepted abbreviations, consult *Logan's Medical and Scientific Abbreviations*. Authors are encouraged to consult *Dorland's Illustrated Medical Dictionary* (28th Edition), *American Medical Association Manual of Style*, and *Council of Biology Editors Style Manual* (available from the Council of Biology Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, USA). The full term for which an abbreviation stands should precede its first use unless it is a standard unit of measurement.

Style: Pattern manuscript style after the *American Medical Association Manual of Style* (9th Edition), *Stedman's Medical Dictionary* (27th Edition) and *Merriam Webster's Collegiate Dictionary* (10th Edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express the units of measure and degrees Celsius to express temperatures, and SI units rather than conventional units.

Permissions: The author is responsible for obtaining written permission to reproduce previously published material (direct quotations, unpublished data, tables, or figures) from the copyright holder. Enclose all letters granting permission at the time the

manuscript is submitted for publication. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use for the borrowed material, not the responsibility of the Triological Society or Wiley-Blackwell. Photographs of recognizable persons must be accompanied by a signed release from the patient. For a photograph of a minor, signed parental permission is required.

Internal Review: All authors are strongly encouraged to have their manuscripts thoroughly and critically reviewed within their institution before submitting to **The Laryngoscope**.

References: The authors are responsible for the accuracy of the references. The Journal complies with the reference style given in “*Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*” (available from *The New England Journal of Medicine*, Bulk Reprints, 1440 Main Street, Waltham, MA 02154, USA; send self-addressed stamped envelope). References are to be cited in numerical order in text and identified by Arabic numerals set in superscript type. Authors will be charged \$3.00 for each reference over 15. The reference section should be typed double-spaced at the end of the text, following the sample formats given below. For abbreviations of journal names, refer to *List of Journals Indexed in Index Medicus* (available from the Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC 20402, USA; DHEW Publication No. (NIH) 91-267; ISSN 0093-3821).

Provide all authors' names when fewer than seven; when seven or more, list the first three and add et al. Provide article titles and inclusive pages. “Unpublished observations” and “personal communications” do not qualify as references and should be placed parenthetically in the text. Accuracy of reference data is the responsibility of the author. Sample references are given below:

Journal article

1. Rand NS, Dawson JM, Juliao SF, et al. In vivo macrophase recruitment by murine intervertebral disc cells. *J Spinal Disord* 2001; 14:339–342.

Book chapter

2. Todd VR. Visual information analysis: frame of reference for visual perception. In: Kramer P, Hinojosa J, eds. *Frames of Reference for Pediatric Occupational Therapy*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999:205–256.

Entire book

3. Webster NR, Galley HF. *Anaesthesia Science*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, Ltd.; 2006.

Software

4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

Online journals

5. Friedman SA. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988;71:22–37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 1996. Updated March 29, 1996.

Websites

7. Gostin LO. Drug use and HIV/AIDS [JAMA HIV/AIDS Web site]. June 1, 1996. Available at: <http://www.ama-assn.org/special/hiv/ethics>. Accessed June 26, 1997.

Figures

Each figure must be identified individually and within the text of the manuscript. Black and white illustrations will be published without charge. Authors will be charged for color illustrations in print. Color illustrations online are free of charge. The Publisher will provide, upon request, an estimate of the cost of color artwork.

Digital art needs to be created/scanned and saved and submitted as either a TIFF (tagged image file format), an EPS (encapsulated postscript) file. PPT (Power Point) files will also be accepted. Electronic photographs—radiographs, CT scans, and so on—and scanned images must have a resolution of at least 300 dpi (dots per inch). Line art must have a resolution of at least 1200 dpi. If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. Color images must be created/scanned and saved and submitted as CMYK files. If you do not have the capability to create CMYK files, please disregard this step. Indicate in your cover letter that you are unable to produce CMYK files. Cite figures consecutively in the text, and number them in the order in which they are discussed.

Digital Art Checklist:

- Create and submit artwork in the actual size it will appear in the journal
- Crop out any extra white or black space surrounding the image
- Text within figures should be in an acceptable font (Helvetica is preferred) and sized consistently throughout the artwork using 8–12 point type
- Text within figures should be embedded in the file or converted to an outline or path
- For black and white images: create and save in grayscale format
- For color files: create and save in CMYK format (not RGB)
- For line art: save and submit at a resolution of at least 1200 dpi
- For images/photographs: save and submit at a resolution of at least 300 dpi
- For combination halftones: save and submit TIFF or EPS files. Do not select “Save as Compressed TIFF” when saving files. PowerPoint files are also acceptable
- Save each figure as a separate file and save them separate from the accompanying text file(s). For multipanel or composite figures only: send as one files with each part labeled the way it is to appear in print
- Name figures in the format: corresponding author’s last name_figure 1.tif, etc.
- Upload figures consecutively to the submission site.

Detailed Figure Instructions: Please refer to this website for detailed information on digital figure preparation, and to check your figure instantly for printer compatibility: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/docs/index.html>

Figure legends: Each figure must be accompanied by an explanatory legend, typewritten with double spacing (legends should be separate from the figures, but do not use a separate sheet for each legend). They should be brief and specific, and they should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used. Explain all symbols used in the figure.

Tables: Each table must be identified individually and within the text of the manuscript. Do not include the same information in both tables and figures. Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (e.g., Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Group all tables in a separate file. Tables should be typed neatly, each table on a separate sheet, with the title above and any notes below. Explain all abbreviations. Tables should be numbered consecutively beginning with Roman numeral I. A table must have at least two columns. Lists are to be incorporated into the text. Each table should appear on a separate page and should include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text. Do not use patient initials in tables. Patients should be referred to by sequential Arabic numerals, not by their initials.

Supporting Information (Supplementary Materials):

Authors may publish additional article-related materials online that complements and reinforces information published in the print journal. Supplementary material posted online is intended to enhance print article content, and may include figures, tables, movies and animation.

All supplemental materials must be submitted with the original submission via Manuscript Central for peer-review and be approved by the Editor in order to be published online. Authors should reference the fact that they have supplied supplemental data with their submission in their cover letter as well as designate the files as Supplemental Files during upload.

There are no restrictions on file types of the data that you submit. Please keep in mind, however, that the more universal the file type, the more accessible to the community.

Because all supplementary materials submitted for addition online are posted exactly as provided to the Publisher, authors are advised to review materials carefully. Data will be posted as it is submitted; it will not be professionally edited or proofread. No additional work or file processing will be performed on any submission. The Publisher will not be responsible for errors or omissions.

Audio and Video Files: Short audio and video clips may be submitted for posting online as a .wav, .avi, .mov or .mpg file format. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The total size of all clips, along with other submitted files for any given article, should not exceed 5MB. File size limitation is intended to ensure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to online and returned to the author for re-submission.

Submitting Revisions: If you have been invited to submit a revised manuscript, please submit it online via your author center following instructions found there. When submitting a revision, please submit both a clean copy and marked copy of the manuscript. The marked copy should highlight all of the changes made by authors after the original review. Authors can use the track changes feature of the Microsoft Word program to create a marked copy. Authors also should submit all tables and figures in separate files for production purposes.

After Acceptance

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (e.g., reprint order form) will be sent to the corresponding author by e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for returning the corrected pages to the Publisher. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style will stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will be disallowed. The Publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections returned within 48 hours of receipt, as requested in the communication accompanying the page proofs.

Reprints Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed to the publisher with the corrected proofs. Reprints are normally shipped 4 to 6 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department: Email: reprints@wiley.com with any questions.

Publisher's Contact: Email corrected page proofs and any other related materials to Production Editor, **The Laryngoscope**, kaccaval@wiley.com

Manuscript Checklist (before submission)

- Title page with complete mailing address and telephone, telefax and e-mail of corresponding author
- Abstract in structured format and keywords
- References double-spaced in AMA style and in proper format, and numerical order in the body of the text
- Permission to reproduce copyrighted materials or signed patient consent forms
- Acknowledgments listed for grants and technical support
- Manuscript conforming to criteria listed in Instructions to Authors
- Clear indication of approval of appropriate institutional research oversight committee

Note to NIH Grantees: Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate .

Ultrasound-Guided Fine Needle Aspiration Biopsy of Thyroid Nodules Performed in the Office

Fine needle aspiration biopsy (FNAB) is the gold standard in the diagnostic evaluation of patients with a thyroid nodule. Ultrasound guidance of FNAB improves the accuracy of sampling, especially in lesions that are small or non-palpable, indistinct lesions, lesions located posteriorly or deep in the thyroid and cystic lesions. Dr. Seiberling and colleagues report experience with ultrasound guided FNAB in 203 patients undertaken in an outpatient office setting. A satisfactory specimen was obtained in 81.2% and the diagnostic rate was 90%. A subgroup of 54 patients went on to total thyroidectomy or thyroid lobectomy. FNAB had a sensitivity of 100%, specificity of 73%, positive predictive value of 57% and negative predictive value of 100%. *See page 228*

The Use of Dexamethasone to Reduce Pain After Tonsillectomy in Adults: A Double-Blind Prospective Randomized Trial

Pain management following tonsillectomy remains an important clinical challenge. Dr. Lachance and colleagues report a prospective randomized clinical trial performed in 102 patients undergoing tonsillectomy. The patients received either dexamethasone or a placebo. Dexamethasone dosing began at 8 mg and was tapered for four days. Pain was evaluated on a visual analog scale. A 13 mm change on the scale was considered clinically significant. Acetaminophen 1,000 mg with hydromorphone 1 mg was employed as needed. The authors observed no statistically significant difference in pain in the two groups. Consumption of hydromorphone was similar. The authors conclude that routine use of dexamethasone following tonsillectomy in adults cannot be recommended. *See page 232*

Glomus Tumors in Patients of Advanced Age: A Conservative Approach

This study sought to identify and discuss controversies in the management of paraganglioma arising in the temporal bone of elderly patients. Twelve patients with a mean age of 74 years were identified. Limited subtotal surgical resection was accomplished in seven patients (58%). This resulted in no cranial nerve deficits and required no blood transfusion. Hearing was preserved. Five patients were treated with observation alone or primary irradiation therapy. At a median follow up of 7.8 years only two patients had disease progression. No patient developed cranium nerve deficit or intracranial extension. Irradiation therapy was employed selectively. The authors advocate conservative therapy in this patient cohort. *See page 270*

Waist Circumference and Sleep Disordered Breathing

Obesity is widely considered an important component of sleep-disordered breathing (SDB). The most commonly employed measurement of obesity is body mass index (BMI). Dr. Davidson and colleague report assessment of a variety of indicators of obesity in 414 patients evaluated for SDB. All metrics for obesity correlated significantly with SDB. When comparing apnea hypopnea index to these metrics, waist circumference was superior to neck circumference or BMI in predicting severity of SDB. *See page 339*



On the Cover

The cover image represents the histoarchitecture of the collagen fibers uniformly distributed within the lamina propria (LP) of the fetal vocal fold immediately below the epithelium (E) and superficially to the vocal muscle (VM). Intertwined fibers form a network arrangement in the form of a "wicker basket." For further information, see the article on page 371 by Buhler et al.

Collagen Fiber and Versican Distribution Within the Lamina Propria of Fetal Vocal Folds

Rogério Borghi Buhler, MD; Luiz U. Sennes, MD, PhD; Thais Mauad, MD, PhD;
Erich Christiano M. Melo, MD; Luiz Fernando F. Silva, MD; Paulo Hilário N. Saldiva, MD, PhD

Objectives: To analyze the presence and distribution of collagen fibers and versican in human vocal fold lamina propria of fetal larynges.

Study Design: Cross sectional analysis of cadaveric vocal folds of human fetuses.

Methods: Seven fetal larynges obtained from 28- to 36-week-old fetuses were analyzed with the Picrosirius-polarization method, immunohistochemistry, and image analysis.

Results: Collagen fibers within the lamina propria exhibited a monolaminar distribution pattern and spatial arrangement in “wicker basket.” Versican distribution was larger in the superficial and intermediate layers when compared to the deep layer.

Conclusion: Our findings suggest that collagen and versican distribution and arrangement within the lamina propria in the developing fetus are important for vocalization at birth.

Key Words: Versican, collagen fibers, lamina propria, fetal larynx, immunohistochemical.

Laryngoscope, 118:371–374, 2008

INTRODUCTION

The lamina propria of human vocal folds is a specific laminar tissue of great importance for vocal production, as explained by the cover-body theory.¹ In adults, it is an area found immediately below the epithelium and superficially to the vocal muscle, composed by extracellular matrix (ECM) proteins and few mesenchymal cells.²

ECM components have a major influence on organ development, affecting replication, migration, differentia-

tion, and functioning of body structures.³ In vocal folds, arrangement of the ECM also has a key impact on biomechanics of voice production.⁴ The fibrillar proteins collagen and elastin are responsible for the lamina propria fibrous framework. Proteoglycans and glycoproteins are non-fibrillar proteins that fill the space between fibers.³ They frequently affect the viscosity, amount of fluid, thickness of the lamina propria and, many times, the density and size of collagen fibers.⁵

Proteoglycans represent a family of macromolecules composed of a central protein and lateral chains of sulfated polysaccharides and glycosaminoglycans (GAGs) covalently bound.⁶ The GAGs consist of a repeated structure of sulfated disaccharides that are classified according to their carbohydrate component.⁷ Proteoglycans are involved in the maintenance of biophysical properties of various tissues and in biologic interactions that take part in tissue hydric balance, vascular permeability, cell migration, proliferation, and differentiation.⁸ Versican is a large proteoglycan chondroitin sulfate that is present in the adult human vocal fold, and it is one of the main components in the extracellular matrix of the lamina propria.^{5,9,10}

Collagen fibers have an important role on vocal physiology, providing adequate tension and malleability. Melo et al.¹¹ described the distribution of collagen fibers in three distinct layers and their “wicker-basket” arrangement that is involved in vibration dynamics.

The lamina propria of the human vocal folds is described since the 13th week of gestation¹² and specific cells in the macula flava are involved in the production of ECM.¹³ In the fetus and newborn, no histologic distinct layers and no defined vocal ligament are present.^{14–17} However, there are scarce data on composition and arrangement of the ECM components within the fetal vocal fold. Such knowledge is important because fetal composition and arrangement of the ECM within the lamina propria may have an important role in the development of phonation-induced tissue changes.¹⁵

Therefore, in this study our aim was to describe the arrangement and composition within the fetal lamina

From the Department of Otolaryngology (R.B.B., L.U.S., E.C.M.d.M.), and the Department of Pathology (T.M., L.F.F.d.S., P.H.N.S.), the University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication August 28, 2007.

This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Agency) and Central Hospital—University of São Paulo School of Medicine.

Send correspondence to Rogério Borghi Buhler, Rua Aliança Liberal 1015, Ap. 101/D2, 05088-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: rrbuhler@uol.com.br

DOI: 10.1097/MLG.0b013e318159aa0d

propria of two major ECM components of the lamina propria: versican and collagen.

METHODS

The study was approved by the Ethics Committee for Research Project Analysis of the Clinical Board of the University of São Paulo School of Medicine.

Human larynges were obtained from stillborn fetuses autopsied at the São Paulo Autopsy Service, University of São Paulo. The larynges of seven fetuses (three females) were included in the study, with a median age of 31 weeks, ranging from 28 to 36 weeks. Three fetuses were of the white race and four of the black race. Fetuses presented no malformations and no macroscopic abnormalities in the larynx. We have only included cases autopsied within 24 hours after death and that were not macerated. After those initial procedures, in bloc exeresis of the larynx was performed and the right vocal fold was obtained from each larynx and fixed in 10% formalin solution for 24 hours. Afterwards, 1- to 2-mm-thick coronal sections in relation to the vocal fold were performed on the middle portion of the fold membranous region, dehydrated in progressive alcoholic concentrations and embedded in paraffin. Tissue blocks were submitted to 4- μ m-thick histologic sections and hematoxylin and eosin (H&E) stained for initial analysis.

For visualization of collagen fibers, slides were stained with Sirius red as previously described.¹¹ For the analysis of versican expression, immunohistochemical reactions were carried out using monoclonal antihuman antibody large proteoglycan versican (Seikagaku America, Inc., Ijamsville, MD). Briefly, sections were incubated in 0.05 U/mL ABC chondroitinase solution (Sigma, Oakville, ON, Canada), for 1 hour, at 37°C, and then incubated with the primary antibody (1:500 dilution) in 1% BSA/PBS between 4°C and 8°C overnight. As secondary antibody, LSAB+Ap (Dako, Carpinteria, CA) and Fast Red (Sigma, Steinheim, Germany) were employed as chromogen. The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Incubation with PBS supplemented with 1% BSA instead of the primary antibody served as a negative control.

For qualitative and quantitative analyses expression, we divided lamina propria compartments according to the model proposed by Butler et al.¹⁸ For collagen analysis, Sirius red was analyzed with the polarization method.¹⁹

Measurement of positive stained areas were performed by image analysis using a system comprising of a light microscope Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Germany) connected to a computer through a video camera using the software Image Pro Plus, version 4.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). For each lamina propria compartment, three non-overlapping areas at 400 \times magnification were analyzed, comprising nine analyzed areas for each section. Results were expressed as stained area/total area ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$).

Data were expressed as medians and ranges. Comparison of stained areas within the three compartments was performed using Friedman and Wilcoxon's non-parametric statistical tests. All tests were done in the SPSS software, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), and *P* values lower than .05 were considered significant.

RESULTS

Collagen fibers were identified in the lamina propria of fetal vocal fold under conventional and polarized light (Fig. 1) with a "wicker basket" arrangement (Fig. 2). The distribution of collagen fibers was homogeneous on all its thicknesses, and there was no statistical difference throughout its distribution among superficial (S), inter-

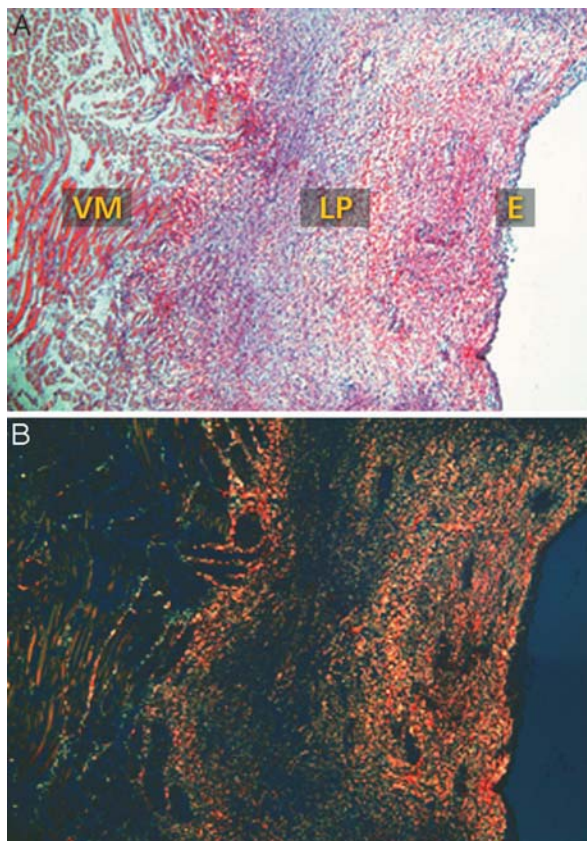


Fig. 1. (A) Transversal histologic section of picosirius-stained fetal vocal fold visualized under conventional light (50 \times magnification); E = epithelium; LP = lamina propria; VM = vocal muscle. (B) Transversal histologic section of picosirius-stained fetal vocal fold visualized under polarized light (50 \times magnification).

mediate (I), and deep (D) layers ($S = 0.69$ [0.25–0.77]; $I = 0.73$ [0.26–0.91]; $D = 0.61$ [0.36–0.81], $P = .56$).

There was a diffuse positive versican staining in all laminar layers with a stronger staining in the subepithelial region (Fig. 3). Morphometric analysis revealed that versican density differed significantly among layers within the lamina propria, being lower in the deep layer when compared to the superficial ($D = 0.13$ [0.05–0.18]; $S = 0.23$ [0.05–0.31], $P = .041$) and the intermediate layers ($I = 0.16$ [0.09–0.20], $P = .018$); however, there was no difference between the superficial and intermediate layers (Fig. 4). Figure 5 shows three-dimensional graphic illustrations of the histoarchitecture of the collagen fibers.

DISCUSSION

In this study we describe the distribution of collagen fibers and versican within the lamina propria of 28- to 36-weeks-old human fetuses. Our data show that while there is a uniform distribution of collagen fibers within the lamina propria, versican density is increased in the superficial and intermediate layers. To our knowledge, we are the first to analyze versican expression within the lamina propria of human fetal vocal folds.

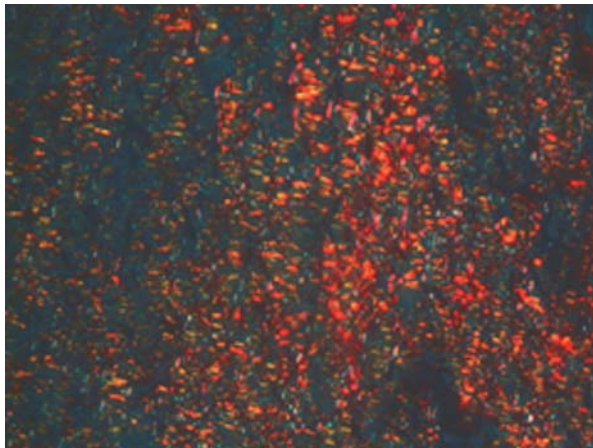


Fig. 2. Transversal histologic section of fetal vocal fold stained by Picrosirius, visualized under polarized light, showing a "wicker basket" arrangement of collagen fibers (400× magnification).

There are a few studies on the histologic aspects of the human vocal folds. Progressive alterations in the composition of the lamina propria are related during fetal development. In 13-week-old fetuses it is basically comprised of mesenchymal cells. From 16 weeks onwards, slender fibers distributed parallel to the free border begin to appear. At 23 weeks of gestation, collagen fibers are distributed in a single layer over all thicknesses of the vocal fold.^{12,20} Similarly, previous ultrastructural studies on the fetus vocal fold described an uniform distribution of collagen fibers without a clear layer distinction.^{13–16} Our quantitative analysis of collagen fibers confirms these findings.

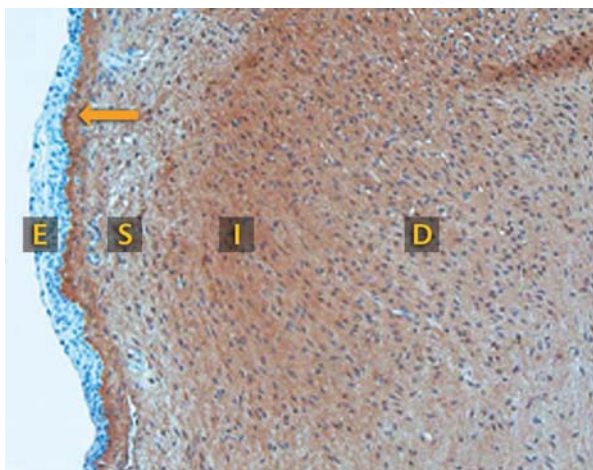


Fig. 3. Transversal histologic section of fetal vocal fold stained by specific immunohistochemical technique for the versican proteoglycan (brown coloration), showing its distribution on superficial (S), intermediate (I), and deep (D) layers of the lamina propria. Note the predominance on the subepithelial region (arrow) (200× magnification); E = epithelium.

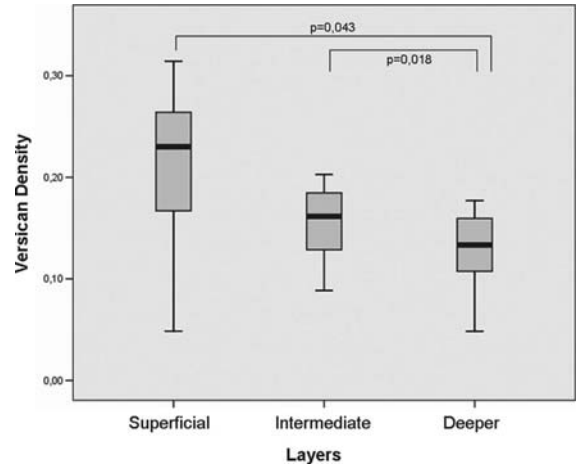


Fig. 4. Distribution of versican within the lamina propria layers in vocal folds of fetuses. The horizontal line represents the median.

The collagen distribution in fetus differs from the findings on the adult population. Melo et al.¹¹ described a "wicker basket" configuration of collagen fibers in adults, and hypothesized that this configuration might have important implications for vocal production. However, there were no data available as to whether this collagen fiber configuration would be already present in fetuses, or if it would be part of the maturation process of the ECM, originating from the vibratory stimulus during phonation after birth. We now demonstrate that the "wicker basket" arrangement of these fibers is already present in 28- to

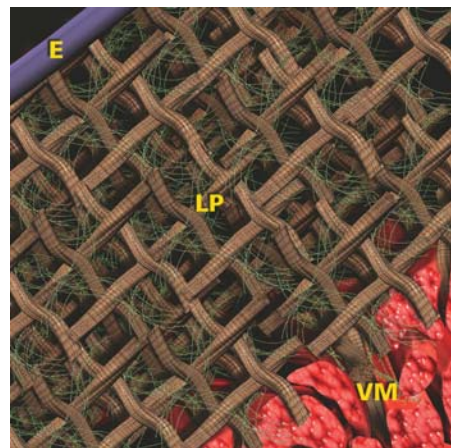


Fig. 5. Histoarchitecture of the collagen fibers uniformly distributed within the lamina propria of the fetal vocal fold. Intertwined fibers forming a network arrangement in the form of a "wicker basket"; E = epithelium; LP = lamina propria; VM = vocal muscle.

36-week-old-fetuses. Although we have not examined other important components of the vocal fold ECM and larynx innervation, this finding suggests that despite no existing

intrauterine demand for vocal structure use, this organ might be prepared for phonation immediately after birth.

The presence of versican in adult vocal folds has been previously described, but no reports on fetal vocal folds were available so far. Our data show that versican is diffusely present in the ECM, with a significant increased density in the superficial and intermediate layers when compared to the deep layers, with a stronger staining observed in the subepithelial region. Interestingly, a similar distribution of versican in the upper dermis in mid-age fetuses (of a similar age range as the present study) was described by Sorrell et al.²¹ In adult vocal folds, Hahn et al.¹² described a most intense staining in the superior portion of the intermediate layer.

The role of versican in the fetal vocal folds is not clear. Versican forms aggregates with hyaluronic acid, and these aggregates have an importance role in tissue viscosity, osmosis, and resistance.⁹ In addition, these structures form complex interactions with fibronectin, type I collagen²¹ and elastic networks.¹⁰ Versican predominance within the superficial and intermediate layers might be important in determining collagen deposition and distribution in the developing vocal fold, since proteoglycans have an important role in regulating collagen fibrillogenesis.⁶ The increased versican presence in the superficial and intermediate layers may contribute to the “wicker-basket” arrangement of the developing collagen fibers at this level. On the other hand, less versican in the deeper layer of the lamina propria may provide structure for a more dense collagen arrangement, adequate for the physiologic function of transmitting tension from vocal musculature to the rest of the lamina propria during voice modulation. In addition, predominance of versican in superficial and intermediate layers could be important in absorbing impact during vocalization at birth.

CONCLUSION

In this study, novel information is presented about the ECM composition in the fetus vocal folds. Collagen fibers are uniformly distributed within the lamina propria, and present the “wicker basket” arrangement as described in adults. In contrast, versican density is larger in the superficial and intermediate layers when compared to the deep layer.

Acknowledgments

The authors thank Prof. Dr. Chao Lung (Discipline of Telemedicine—the University of São Paulo School of Medicine) for assistance in three-dimensional graphic representation. The authors would also like to acknowledge the autopsy assistants of the SVOC-USP who helped gather the study material, and Sandra de Moraes for support in the immunohistochemical procedures.

BIBLIOGRAPHY

1. Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, ed. *Vocal Fold Physiology*. San Diego, CA: Singular Publishing Group; 1993.
2. Catten M, Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Gray SD. An analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118:663–667.
3. Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett* 1990;268:386–393.
4. Chan RW, Gray SD, Titze IR. The importance of hyaluronic acid in vocal fold biomechanics. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;124:607–614.
5. Pawlak AS, Hammond E, Hammond T, Gray SD. Immunohistochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:6–11.
6. Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609–652.
7. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;12:137–147.
8. Zhang Y, Cao L, Yang BL, Yang BB. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 1998;273:21342–21351.
9. Gray SD, Titze IR, Chan Roger, Hammond T. Vocal fold proteoglycan and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109:845–854.
10. Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Midmembranous vocal fold lamina propria proteoglycans across selected species. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:451–462.
11. Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003;113: 2187–2191.
12. Subotic R, Vecerina S, Krajina Z, Hirano M, Kurita S. Histological structure of vocal fold lamina propria in foetal larynx. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1984;97:403–406.
13. Sato K, Nakashima T. Vitamin A – storing stellate cells in the human newborn vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:517–524.
14. Sato K, Hirano M, Nakashima T. Fine structure of the human newborn and infant vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2001;110:417–424.
15. Hirano M, Kurita S, Nakashima T. Growth, development and aging of human vocal folds. In: Bless DM, Abbs JH, eds. *Vocal Fold Physiology*. San Diego, CA: College Hill Press; 1983:22–43.
16. Hartnick CJ, Rehbar R, Prasad V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope* 2005;115:4–15.
17. Ishii K, Yamashita K, Akita M, Hirose H. Age related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000;109:1055–1064.
18. Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope* 2001;111:907–911.
19. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem* 1979;11: 447–455.
20. Kuritas S. Layer structure of the human vocal fold: morphological investigation. *Otologia (Fukuoka)* 1980;26:973–997.
21. Sorrell JM, Carrino DA, Baber MA, Caplan AI. Versican in human fetal skin development. *Anat Embryol* 1999;199: 45–56.

**Collagen Type I, Type III and Versican Distribution within the Lamina Propria of
Human Vocal Fold**

Collagen Type I, Type III and Versican Distribution within the Lamina Propria of Human Vocal Fold

This work was supported by FAPESP (São Paulo State Research Agency), and HC-FMUSP.

From the Department of Otolaryngology (Rogerio Borghi Bühler, MD; Luiz Ubirajara Sennes, MD, PhD; Domingos Hiroshi Tsuji, MD, PhD) and Department of Pathology (Thais Mauad, MD, PhD; Luiz Fernando Ferraz da Silva, MD; Paulo Hilário Nascimento Saldiva, MD, PhD), The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil.

Send correspondence to Rogerio Borghi Bühler, Rua Tenente Negrão 140, Cj. 91, 04530-030, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: rbbuhler@uol.com.br

SUMMARY

Objectives: Extracellular matrix distribution within the lamina propria may be related to phonation mechanics. In this study, we analyzed the distribution of collagen type I, collagen type III and versican in human vocal fold lamina propria. **Study design:** Cross sectional analysis of cadaveric vocal folds of adult human larynges. **Methods:** Twenty larynges obtained from autopsy specimens were analyzed with immunohistochemistry and image analysis. **Results:** There was a lower collagen type I density in the intermediate layer (IL) when compared to the superficial (SL) and the deep (DL) layers. Collagen type III presented a lower density in the IL when compared to the DL layer. There was a lower versican density in the SL when compared to the IL and the DL. There was a lower versican density in the lamina propria of females when compared with males. The difference was noted in the superficial layer only. There was a positive correlation between collagen III and versican within the lamina propria. **Conclusion:** Collagen type I, type III and versican are differently distributed within the adult vocal fold lamina propria layers.

Key Words: versican, collagen type I, collagen type III, lamina propria, vocal fold, immunohistochemical.

INTRODUCTION

Human vocal folds (VF) are histologically comprised by the epithelium, the three layers of lamina propria (LP) and the vocalis muscle. The cover-body theory of phonation explains how the intricate relation among the layered structures of the LP contributes to voice production by allowing the VF to vibrate with consistency and control.¹

The extracellular matrix (ECM) proteins of the vocal fold lamina propria consist of fibrillar and interstitial proteins. The main fibrillar proteins in the VF lamina propria comprise the collagen and the elastic fibers. The composition of fibrillar and interstitial proteins within the VF determine many of the oscillatory characteristics of this structure.^{2,3}

Collagens represent a family of proteins that serve primarily as the supporting elements in tissue structure and contribute to tissue tensile strength and stability but also regulate cellular migration and tissue remodeling during growth, differentiation, morphogenesis and wound healing.⁴ Collagens are a major component of the human VF, representing 43% of the total tissue protein.⁵ The relative density of collagen fibers varies within the human lamina propria layers. Some studies have previously shown that the density of total collagen is higher in the superficial and deep layers.^{5,6,7} It's structural arrangement within the VF lamina propria is believed to have an important impact in phonation.⁸

There are various subtypes of fibrillar collagens and each one is uniquely suited for performing specific organ tasks.⁹ Collagen type I is the most ubiquitous and mainly

appear as the fibrillar bundles providing a structure of high tensile strength. Collagen type III is present in most tissues that require flexibility and elasticity. Collagen type I and type III have been immunohistochemically identified as the major collagens in the VF lamina propria^{5,10} but there are few quantitative data on the distribution of collagens type I and III within the lamina propria layers of human adult vocal folds.

Proteoglycans (PG) represent a family of complex molecules composed of core proteins to which glycosaminoglycans (GAG) side chains, such as dermatan sulfate, chondroitin sulfate, keratan sulfate, and heparan sulfate are attached. They provide growth supportive or suppressive function, modulate wound repair, bind and deliver growth factors. One of these proteins, the large proteoglycan versican, has the ability to regulate water content in tissues, thereby affecting resiliency.^{11,12} Versican is known to be present in fetal and adult human vocal folds; and it interacts with collagen deposition by regulating its fibrillogenesis.^{2,10,11,13} No quantitative studies analyzed versican distribution within the 3 lamina propria layers.

It is plausible to assume that the distribution of collagen types and versican may vary within the LP of the vocal folds, since each layer may be submitted to different mechanical stresses during phonation. To better understand this subject, we analyzed the distribution of collagen type I, type III and versican within the lamina propria of female and male adult vocal folds.

METHODS

The study was approved by the Ethics Committee for Research Project Analysis of the Clinical Board of the University of São Paulo School of Medicine.

Human larynges were obtained from cadavers autopsied in the São Paulo Autopsy Service within 24 hours after death. Larynges were obtained from twenty adults (10 males and 10 females). Patient's mean (\pm SD) age was 67 (\pm 9) ranging from 50 to 85 years. Mean age of males was 66 and 70 from females, without significant statistical difference between groups. Thirteen adults were from the white race and seven from the black. Cadavers with a medical history of neck manipulation as oral or nasal intubation, tracheotomy, laryngeal surgery and head and neck irradiation were excluded. Only larynges from non-smoking subjects were included in the study.

In bloc exeresis of the larynx was performed, all specimens presented no macroscopic lesions. The left vocal fold from each larynx was obtained and fixed in 10% formalin solution for 24 hours. Afterwards, 5-mm-thick coronal sections in relation to the vocal fold were performed on the middle portion of the fold membranous region, dehydrated in progressive alcoholic concentrations and embedded in paraffin. Tissue blocks were submitted to 4- μ m-thick histological sections and hematoxylin-eosin (H&E) stained for initial analysis.

For the analysis of collagen type I and type III expression, immunohistochemical reactions were carried out using monoclonal anti-human antibody (C7510 12A, United States Biological, Swampscott, MA, USA) with 1:250 dilution and monoclonal anti-

human antibody (CP19L, Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) with 1:500 dilution. To analyze versican expression a specific monoclonal anti-human antibody large proteoglycan versican (Seikagaku America, Inc; Rockville, MD, USA) was used.

For the antibody versican, sections were pretreated with a 0.05 U/ml ABC chondroitinase solution (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), for one hour, at 37⁰C. Subsequently, sections were incubated with the primary antibody in 1% BSA/PBS between 4⁰C and 8⁰C overnight. As secondary antibody, LSAB+Ap (Dako, Carpinteria, CA, USA) and Fast Red (Sigma, Steinheim, NRW, Germany) were employed as chromogens. The slides were counter-stained with Mayer's Hematoxylin. Incubation with PBS supplemented with 1% BSA instead of the primary antibody served as a negative control.

For quantitative analyses of collagens and versican expression, we divided the lamina propria compartments according to the model proposed by Butler et al.¹⁴ in three layers: superficial, intermediate and deep. Measurement of positive stained areas were performed by image analysis using a system comprising of a light microscope Leica DMR (Leica Microsystems, Wetzlar, Hesse, Germany) connected to a computer through a video camera using the software Image Pro Plus[®] 4.1 version (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For each lamina propria compartment three non-overlapping areas at 400x magnification were analyzed, comprising 9 analyzed areas for each section. Results were expressed as stained area/total area ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$). Data were expressed as medians and ranges. Comparison of stained areas within the 3 compartments was performed using ANOVA or Kruskal-Wallis followed by post-hoc Tukey's b or Bonferroni respectively (depending on data distribution). Data were log-transformed before analyses and performed in the SPSS software 15.0 version (SPSS

Inc., Chicago, IL, USA). Correlation among ECM elements was performed using the Spearman correlation test. P values lower than .05 was considered significant.

RESULTS

Collagens and versican stained as fibrillar structures in the lamina propria and among the vocal muscle cells. There was a lower collagen type I density in the intermediate layer when compared to the superficial ($p < 0.001$) and the deep layers ($p = 0.005$) (Figure 1a). Collagen type III had a more homogenous distribution within the VF layers, with a statistically lower density of collagen type III in the intermediate layer when compared to the deep layer ($p = 0.001$), but without differences in the superficial layer (Figure 1b). There was a lower versican density in the superficial layer when compared to the intermediate ($p = 0.036$) and the deep layer ($p = 0.013$) (Figure 1c).

When all layers were considered together, there was a positive correlation between versican and collagen III densities ($r = 0.57$, $p = 0.010$) (Figure 2).

Morphometrical analysis categorized by gender revealed that collagen type I, collagen type III and versican density differed significantly among layers within the lamina propria. Females had a lower density of collagen type I in the intermediate when compared to superficial ($p = 0.02$) and deep layers ($D = 0.28$ [0.10-0.51], $p = 0.02$). For males, no differences were observed (Figure 3a). There was no difference in collagen type III distribution in the female group within layers. On the other hand, there was a higher collagen type III density in the deep layer when compared to the superficial ($p = 0.037$) and the intermediate layer ($p = 0.018$) in males (Figure 3b). There was lower versican female density in the superficial layer when compared to the intermediate ($p = 0.031$) and the deep layer ($p = 0.021$). There was no statistical difference in versican density among layers in the male group (Figure 3c).

There was no difference between total density of collagen type I and collagen type III in male and female lamina propria vocal folds. There was a higher versican density in the lamina propria of females when compared with males. The difference was noted in the superficial layer only ($p=0.049$) (Figure 4). There were no correlations between collagens and versican density in the lamina propria and patient's age in male and females. Figure 5 shows three dimensional graphic illustrations of histoarchitecture of the collagen and versican distribution in lamina propria vocal fold.

DISCUSSION

In this study we described the distribution of collagens type I, type III and versican within the lamina propria of age-matched female and male adult vocal folds. Our data show that collagens type I and III and versican vary its distribution within the lamina propria of vocal folds, with gender variation.

The distribution of total collagen (as detected with Sirius Red staining) in human vocal folds has been described to be similar in all age groups, but with varying concentrations according to age and gender.⁸ In adult normal vocal folds, most collagen is present in a superficial band immediately below the epithelium as well as in deep lamina propria adjacent to the vocalis muscle,^{6,8} with a higher concentration in males and geriatric males.⁶ We confirmed this distribution for collagen type I, i.e., predominance in superficial and deep layers. When categorized by gender, our data show that these differences were more accentuated within the female group, but without differences between genders.

Collagen type III analysis also revealed differences in distribution within the lamina propria, with a higher content in the deep than in the superficial and intermediate layers. Our data show that these differences were more accentuated within the male group, but again without significant differences between genders. Since collagen type III tends to be more highly concentrated in dynamic regions of elastic tissues, differences in the distribution of collagen types I and III can potentially give insight into the stresses sustained by different LP regions.¹⁵ As suggested by Tateya et al,⁷ collagen type I provides the tensile strength required around the basal membrane and vocal

ligament to maintain the vocal fold shape during vibration, while the more homogenous distribution of collagen type III may be important to maintain tissue elasticity.

Versican is a large aggregating PG that binds to hyaluronic acid (HA)¹¹ and that frequently interacts with elastic networks.¹⁶ The highly hydrated versican-hyaluronic acid complex play a significant role in inhibiting cell-matrix interactions, affecting turgor, dissipating impact and compressive stresses in the VF lamina propria.¹⁷ The presence of versican in adult and fetal vocal folds has been previously described^{10,18,19}, but no studies have assessed its distribution within the LP layers in adults. Our data show that versican density is higher in the intermediate and deeper layers, this difference being more accentuated in females; with an increased content of versican in the superficial layer of males. Our data are in disagreement with Hahn et al.¹⁰ that could not find differences in versican distribution between males and females. However, those authors examined a smaller population than ours (5 patients) using only semi quantitative analysis.

Our previous and present data show that the distribution of versican within the human LP varies according to age. In the fetus, versican density was higher in the superficial layer.¹³ On the other hand versican density was lower in the superficial layer of adults when compared to the other layers. The reasons for such differences are not clear. It has been shown that, in the presence of some proteoglycans, collagen synthesis yield thinner fibrils. Such theory could explain the higher density of collagen type I (thick fibrils) and the smaller density of versican in the superficial layer in adults. Further, this is also in line with our findings of a positive correlation between collagen III (thinner fibrils) and versican densities in the lamina propria.

Understanding gender differences in ECM composition in the vocal fold LP is of interest since it may provide insights into the greater vulnerability of women to LP scarring and certain vocal fold disorders.⁵ Although adult men may have higher total concentration of collagens in the lamina propria, our and Hahn's data show that the distribution of the collagens type I and type III between genders is similar. On the other hand, the density of versican was higher in the superficial layer of males. This data may help explain the higher predisposition in women to the occurrence of benign laryngeal lesions like vocal nodules. Versican has likely an important role in absorbing impacts between VF during phonation. With a smaller density of versican in the SL, it is possible that the vocal fold is more prone to mechanical damage during phonation.

Others have detected correlation between age and collagen expression, with increased collagen content in the elderly.⁶ In our study we could not find such correlations, since our study group was comprised by an adult population of a limited age interval, which is a limitation of the present work.

CONCLUSION

Our data show, in adults, collagen type I, type III and versican are differently distributed within the adult vocal fold lamina propria layers, with gender variations. Better knowledge about ECM distribution within the LP is important to understand the mechanics of phonation and disease pathogenesis in vocal folds.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Dr. Chao Lung (Discipline of Telemedicine - The University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil) for assistance in three-dimensional graphic representation. We would also like to acknowledge the autopsy assistants of the SVOC-USP who helped us in gathering the study material.

BIBLIOGRAPHY

1. Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR, ed. *Vocal Fold Physiology*. San Diego: Singular Publishing Group; 1993.
2. Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond T. Vocal fold proteoglycans and their influence on biomechanics. *Laryngoscope* 1999;109:845-854.
3. Gray SD. Cellular physiology of the vocal fold. *Otolaryngologic Clin North Am* 2000;33:679-697.
4. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet* 2004;20:33-43.
5. Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115: 225-232.
6. Hammond TH, Gray SD, Butler JE. Age and gender-related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 913-920.
7. Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2006; 115: 469-476.
8. Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope* 2003;113:2187-2191.
9. Tateya T, Tateya I, Bless DM. Immuno-scanning electron microscopy of collagen types I and III in human vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2007; 116: 156-159.

10. Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Midmembranous vocal fold lamina propria proteoglycans across selected species. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114: 451-462.
11. Iozzo R V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 1998;67:609-652.
12. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 1992;12:137-147. 12
13. Buhler RB, Sennes LU, Mauad T, Melo ECM, Silva LFF, Saldiva PHN. Collagen fiber and versican distribution within the lamina propria of fetal vocal folds. *Laryngoscope* 2008;113:2187-2191.
14. Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender-related differences of hyaluronic acid distribution in the human vocal fold. *Laryngoscope* 2001;111:907-1. 14
15. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther* 1999;79:308-319. 15
16. Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibers. *J Cell Sci* 2002;115:2817-2828. 16
17. Laurent TC, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397-2404. 17
18. Pawlak AS, Hammond E, Hammond T, Gray SD. Immunohistochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1996;105:6-11.
19. Skandalis SS, Theocharis AD, Papageorgakopoulou N, Vynios DH, Theocharis DA. The increased accumulation of structurally modified versican and decorin is related with the progression of laryngeal cancer. *Biochimie* 2006;88:1135-1143.

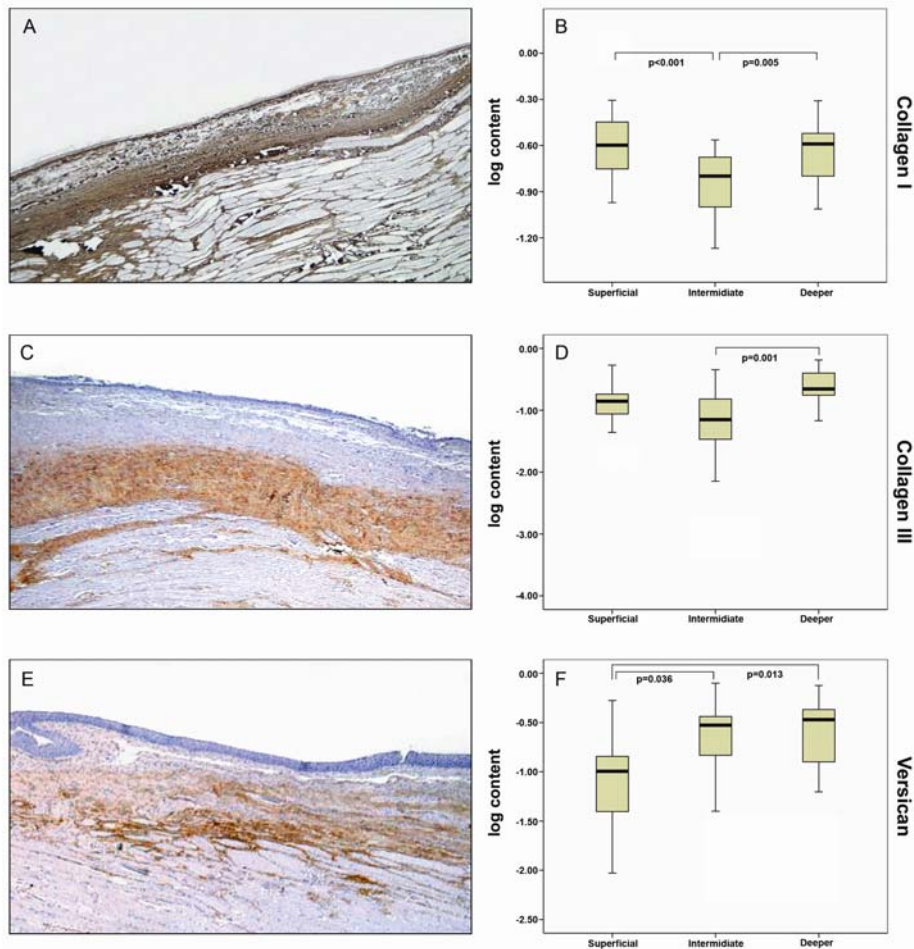


Figure 1. Expression of extracellular matrix components (ECM) in coronal histological section of the middle membranous portion of vocal folds lamina propria in males and females (50x magnification) and the distribution within the vocal fold layers (horizontal line represents the median). **A.** Immunohistochemical expression of collagen type I **B.** Lower collagen type I density in the intermediate layer (IL) when compared to the superficial layer (SL) and the deep layer (DL). **C.** Immunohistochemical expression of collagen type III. **D.** Lower density of collagen type III in the IL when compared to the DL **E.** Immunohistochemical expression of versican. **F.** Lower versican density in the SL when compared to the IL and the DL.

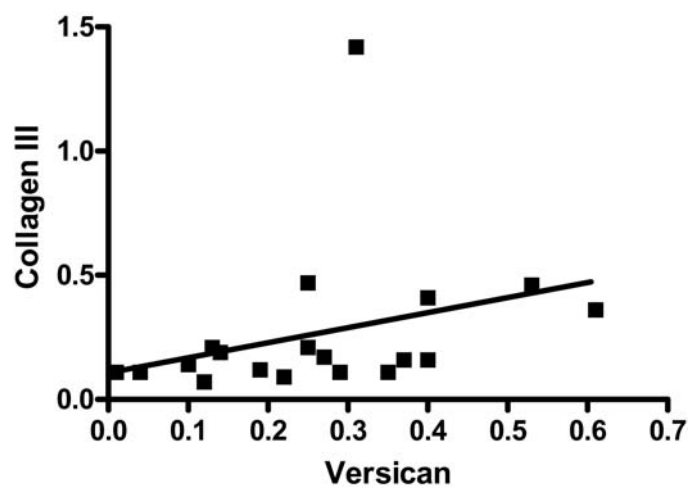


Figure 2. Positive correlation between versican and collagen type III density ($r = 0.57$, $p=0.010$) in adult lamina propria vocal folds.

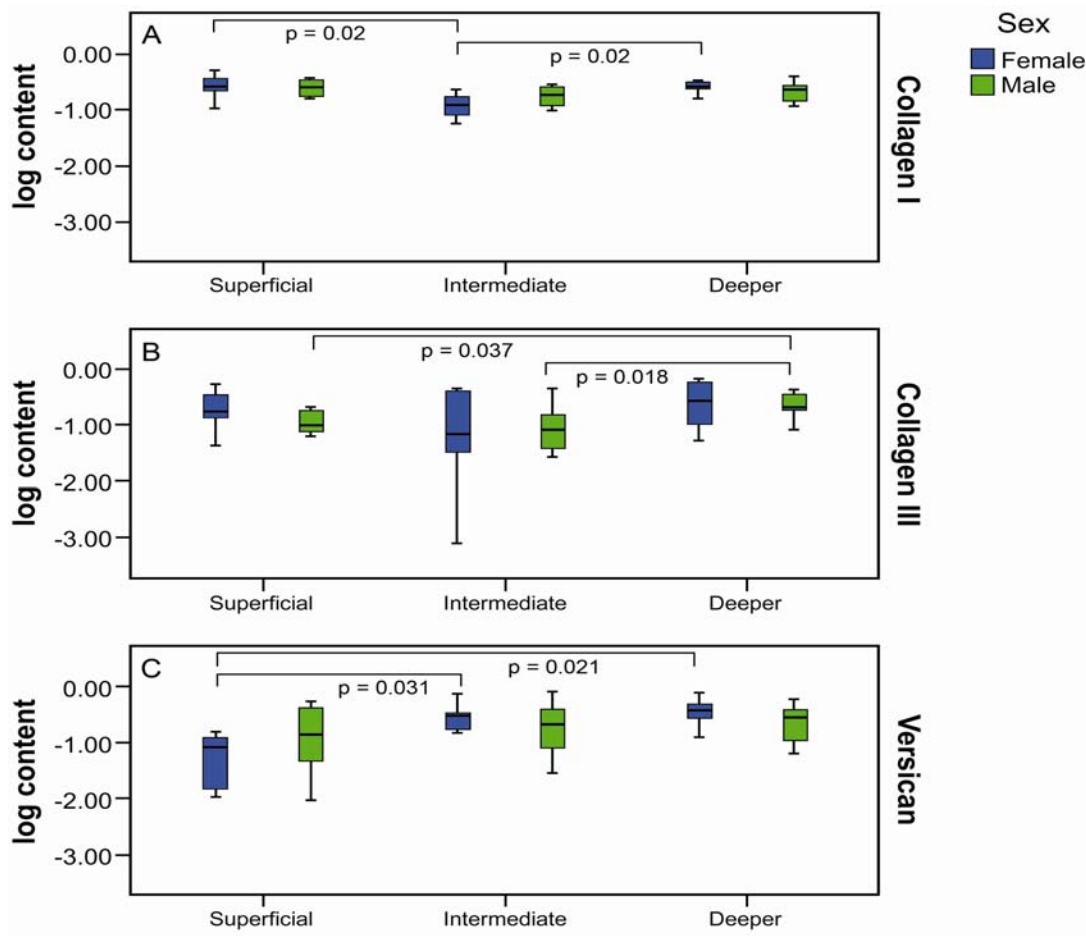


Figure 3. Distribution of collagen type I, type III and versican in lamina propria vocal fold of male and females. The horizontal line represents the median. **A.** Females had a lower density of collagen type I in intermediate layer (IL) when compared to the superficial layer (SL) and the deep layer (DL). For males, no differences were observed. **B.** No difference in collagen type III distribution in the females. In males there was a higher collagen III density in DL when compared to the SL and the IL. **C.** Lower versican female density in the SL when compared to the IL and DL. No difference in versican density in the male group.

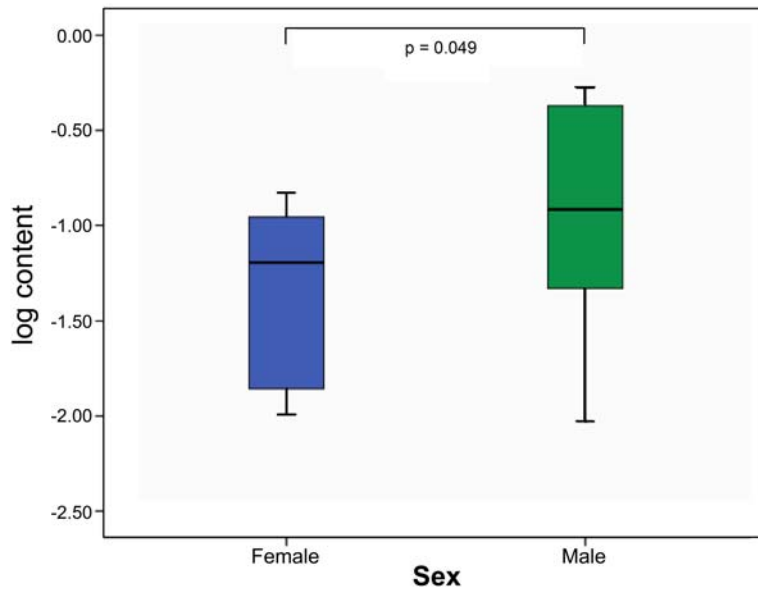


Figure 4. Distribution of versican in lamina propria vocal fold showing a higher density in the superficial layer of females when compared with males ($p=0.049$). The horizontal line represents the median.

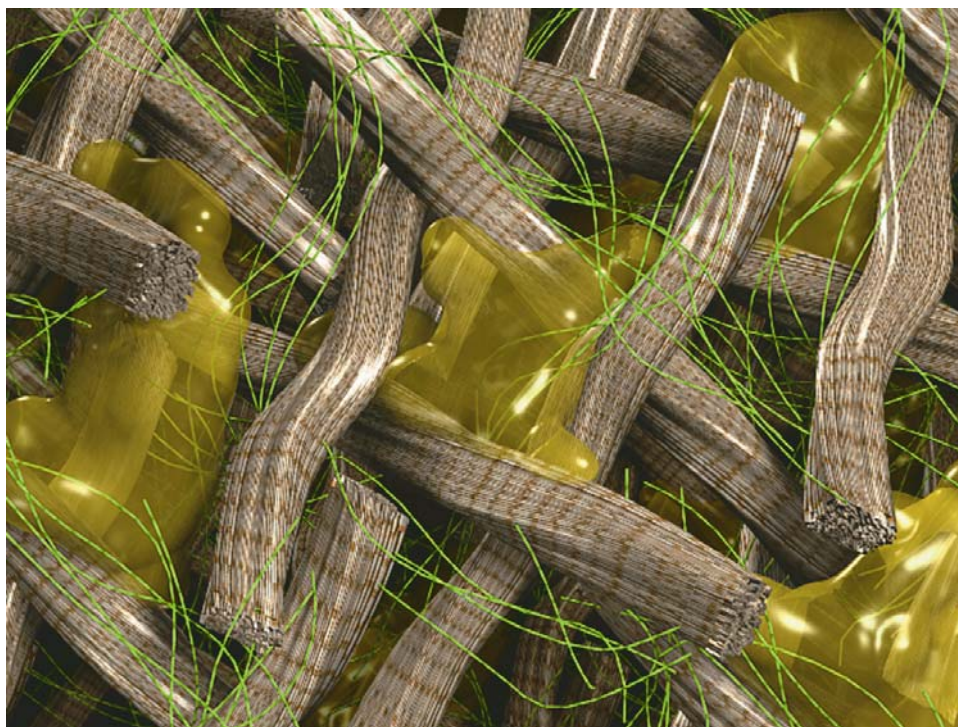


Figure 5. Histoarchitecture of the collagen type I, collagen type III and versican distributed within the adult lamina propria vocal fold; brown fiber = collagen type I; green fiber = collagen type III; yellow substance = versican.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABC	do inglês avidin biotin complex, complexo avidina-biotina
BSA	do inglês bovine serum albumin, albumina bovina
CA	estado da Califórnia, Estados Unidos da América
CAPPesq	Comissão de Ética para Projetos de Pesquisa
⁰ C	grau <i>Celsius</i> , medida de temperatura
E	epitélio
ed	edição
et al.	e outros
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
I	camada intermediária da lâmina própria
IL	estado de Illinois, Estados Unidos da América
Inc	do inglês <i>Incorporation</i> , empresa
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LCD	do inglês <i>liquid crystal display</i> , tela de cristal líquido
Log content	conteúdo (objeto do estudo) “logado”
LP	lâmina própria
µm	micrômetro, a milionésima parte do metro
ml	mililitro, um milionésimo de litro
MD	estado de Maryland, Estados Unidos da América
ON	província de Ontário, Canadá
P	camada profunda da lâmina própria

<i>p</i>	proporção, representação da significância estatística
p	página
%	porcentagem, por cento
PBS	do inglês phosphate-buffered saline, solução de fosfato tamponada
®	marca registrada
r	valor calculado do coeficiente de correlação de Pearson
S	camada superficial da lâmina própria
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SVOC	Serviço de Verificação de Óbitos da Capital
U	unidade internacional, medida padronizada
v	volume
VM	músculo vocal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica esquemática do proteoglicano versican. Proteína central (laranja) com glicosaminoglicanas ligadas; cadeias laterais com diversos sítios de ligação (vermelho: ácido hialurônico; azul: fator de crescimento epidérmico; verde: lecitina; amarelo: complemento regulador de proteína)..... 5
- Figura 2.** Analisador digital de imagens composto por microscópio óptico equipado com câmera de vídeo acoplado a um monitor e a computador com programa de análise digital de imagens. 25
- Figura 3.** Interface do programa de análise digital de imagem mostrando a fotomicrografia de toda a extensão da prega vocal. (aumento de 50x). 27
- Figura 4.** Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área a ser estudada marcada em verde. (aumento de 400x)..... 27
- Figura 5.** Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área a ser estudada e aplicação do padrão de cores estabelecido (área positiva) marcado em vermelho. (aumento de 400x). 28
- Figura 6.** Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área total a ser medida marcada em vermelho. (aumento de 400x)..... 28
- Figura 7.** Histograma mostrando a distribuição pareada (curvas similares) das idades nos grupos masculino e feminino permitindo sua comparação. 30
- Figura 8.** Representação gráfica esquemática da região interna da laringe após incisão longitudinal entre as cartilagens aritenóides (visão posterior). Retângulo representando o local do corte coronal da região média da porção membranosa da prega vocal esquerda. 31
- Figura 9.** Corte histológico coronal da região média da porção membranosa de prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz convencional. (aumento de 50x) - barra = 400 µm 36
- Figura 10.** Corte histológico coronal da região média da porção membranosa de prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz polarizada. (aumento de 50x) - barra = 400 µm..... 36

- Figura 11.** Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada por técnica imunoistoquímica específica para o proteoglicano versican (coloração marron) mostrando sua distribuição nas camadas superficial (A), intermediária (B) e profunda (C) da lâmina própria. (aumento de 200x) – barra = 100 µm 37
- Figura 12.** Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz polarizada mostrando um arranjo espacial em “cesta de vime” das fibras colágenas. (aumento de 400x)..... 39
- Figura 13.** Distribuição da densidade do proteoglicano versican nas camadas laminares da lâmina própria da prega vocal fetal. As linhas representam as medianas e as caixas, o intervalo 25-75%..... 40
- Figura 14.** Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada por técnica imunoistoquímica específica para o proteoglicano versican (coloração marron) mostrando seu predomínio na região subepitelial (seta) da camada superficial da lâmina própria. (aumento de 200x). 41
- Figura 15.** Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas distribuídas de forma uniforme na lâmina própria (LP) da prega vocal fetal delimitada superiormente pelo epitélio (E) e inferiormente pelo músculo vocal (VM). 42
- Figura 16.** Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas na lâmina própria da prega vocal fetal (ampliada em relação à Figura 15) mostrando o entrelaçamento das fibras em arranjo denominado em “cesta de vime”. As fibras de coloração marrom sugerem as fibras de colágeno tipo I e as fibras de coloração verde sugerem fibras de colágeno tipo III. 43
- Figura 17.** Expressão do colágeno tipo I num corte histológico coronal da região média da porção membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunohistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de colágeno tipo I na camada intermediária quando comparada à superficial e profunda (B). 44
- Figure 18.** Expressão do colágeno tipo III num corte histológico coronal da porção média da região membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunoistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de colágeno tipo III na camada intermediária quando comparada à profunda (B). 45

- Figura 19.** Expressão do versican num corte histológico coronal da porção média da região membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de versican na camada superficial quando comparada à intermediária e profunda (B)..... 46
- Figura 20.** Gáfico mostrando a correlação positiva entre a densidade de versican e densidade de colágeno tipo III ($r = 0.57$, $p=0.010$) na lâmina própria da prega vocal em adultos..... 47
- Figura 21.** Distribuição do colágeno tipo I na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. Mulheres apresentam menor densidade na camada intermediária quando comparado à superficial e profunda. 48
- Figura 22.** Distribuição do colágeno tipo III na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. Não há diferença na distribuição entre camadas nas mulheres; os homens apresentam maior densidade de colágeno tipo III na camada profunda quando comparada à superficial e intermediária. 49
- Figura 23.** Distribuição do versican na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. As mulheres apresentam menor densidade na camada superficial quando comparado à intermediária e profunda. Não há diferença na distribuição entre as camadas nos homens..... 50
- Figura 24.** Distribuição do versican na lâmina própria da prega vocal com maior densidade na camada superficial de mulheres quando comparado aos homens ($p=0.049$). A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. 51
- Figura 25.** Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual da fibra colágena tipo I (coloração marrom), fibra colágena tipo III (coloração verde) e proteoglicano versican (coloração amarelada) na lâmina própria da prega vocal de adultos..... 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Densidade média das fibras colágenas e versican nas camadas da lâmina própria da prega vocal de laringes fetais. S: camada superficial; I: camada intermediária; P: camada profunda..... 38
- Tabela 2.** Densidade média de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican nas camadas da lâmina própria da prega vocal de laringes adultas. S: camada superficial; I: camada intermediária; P: camada profunda 52

RESUMO

Bühler RB. *Distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal humana de laringes fetais e adultas : método histoquímico e imunoistoquímico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 74p.

A matriz extracelular apresenta importante papel na fisiologia da fonação sendo necessário o conhecimento de seus componentes. Poucos estudos sobre os componentes da matriz em fetos e a ausência de relatos do versican nesta faixa etária, bem como a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre os componentes da matriz em adultos, resultaram na elaboração deste estudo. Analisar a presença e distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e proteoglicano versican na lâmina própria da prega vocal de laringes fetais e adultas é o objetivo do estudo. No grupo fetal foram estudadas 7 laringes obtidas de cadáveres variando de 28 a 36 semanas de idade gestacional. No grupo adulto foram estudadas 20 laringes, 10 do sexo masculino, com média de idade de 66 anos, e 10 do sexo feminino com média de idade de 70 anos, com idades pareadas. Utilizou-se método imunoistoquímico para avaliar a expressão do versican no grupo fetal e adulto. Para a avaliação das fibras colágenas utilizou-se o método da Picrosirius polarização no grupo fetal e imunoistoquímico no grupo adulto. A quantificação das fibras colágenas e do versican foi realizada por meio de análise digital de imagens. Os resultados do grupo fetal mostraram uma distribuição homogênea das fibras colágenas formando uma estrutura monolaminar com um entrelaçamento entre as fibras denominado arranjo em “cesta de vime”; em relação ao versican, este apresentou uma densidade maior na camada superficial e intermediária da lâmina própria. Os resultados do grupo adulto mostraram uma menor densidade de colágeno tipo I na camada intermediária quando comparado à camada superficial ($p < 0.001$) e camada profunda ($p = 0.005$). O colágeno tipo III apresentou distribuição mais homogênea nas camadas da lâmina própria, com uma densidade estatisticamente menor na camada intermediária quando comparada à camada profunda ($p = 0.001$), mas sem diferença estatística na camada superficial. O versican apresentou densidade menor na camada superficial quando comparado à camada intermediária ($p = 0.036$) e camada profunda ($p = 0.013$). Houve menor densidade de versican nas mulheres quando comparado aos homens, percebida apenas na camada superficial. Quando todas as camadas foram consideradas conjuntamente houve uma correlação positiva entre a densidade de versican e colágeno tipo III ($r = 0.57$; $p = 0.010$). Este estudo mostrou as diferenças na distribuição dos componentes da matriz nas camadas da lâmina própria em dois grupos etários proporcionando uma discussão sobre as implicações destes achados na fisiologia vocal e sugerindo que as estruturas glóticas já estariam preparadas para a vocalização ao nascimento.

Descritores: 1.Colágeno tipo I 2. Colágeno tipo III 3.Versican 4.Cordas vocais 5.Laringe 6.Imunoistoquímica

SUMMARY

Bühler RB. *Collagen type I, collagen type III and versican distribution within the lamina propria of fetal and adult human vocal fold: histochemical and immunohistochemical method* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 74p.

Extracellular matrix has an important role in the vocal fold physiology and the knowledge about your components is necessary. Fewer studies about matrix extracellular and no studies about versican in fetuses, and the necessity to improve the knowledge about extracellular matrix components in adults group came us to the elaboration of this study that has the objective to analyze the presence and distribution of collagen type I, type III and versican in human vocal fold lamina propria of fetal and adult larynges. Seven fetal larynges obtained from 28- to 36-week-old cadaveric fetuses were studied. Twenty larynges were obtained from adults (10 males and 10 females). Mean age of males was 66 and 70 from females, without significant statistical difference between groups. For the analysis of versican expression, immunohistochemical reactions were carried out in fetal and adult group. The larynges were analyzed through Picrosirius polarization method and immunohistochemistry to visualize the collagen fibers, in fetal and adult group respectively. Collagen fibers and proteoglycan were quantified using a digital image analysis system. In fetuses, the collagen fibers system exhibited homogeneous distribution pattern in a monolaminar layer and spatial arrangement as in a “wicker basket”; predominance of versican distribution was found out on the superficial and intermediate layer of vocal fold lamina propria. In adult group, there was a lower collagen type I density in the intermediate layer when compared to the superficial ($p<0.001$) and the deep layers ($p=0.005$). Collagen type III presented a lower density in the intermediate layer when compared to the deep layer ($p=0.001$) but without differences in the superficial layer. There was a lower versican density in the superficial layer when compared to the intermediate layer ($p=0.036$) and deep layer ($p=0.013$). There was a lower versican density in the lamina propria of females when compared with males. The difference was noted in the superficial layer only. When all layers are considered together there was a positive correlation between versican and collagen type III densities ($r=0.57$; $p=0.010$). This study shows the differences in the extracellular matrix components distribution in lamina propria vocal folds in fetal and adult group permitting a discussion about the implications in vocal fold physiology and suggesting that laryngeal structures will be prepared to vocalization at birth.

Descriptors: 1.Collagen type I 2.Collagen type III 3.Versicans 4.Vocal cords
5.Larynx 6.Immunohistochemistry

1. INTRODUÇÃO

A prega vocal humana é dividida em epitélio, lâmina própria e músculo vocal. (Hirano e Kakita, 1985). A lâmina própria apresenta características específicas onde uma delicada relação entre as camadas estruturais permite a vibração da prega vocal de forma adequada sendo de grande importância na produção vocal como explicado na teoria corpo-cobertura (Gray et al., 1993).

A lâmina própria da prega vocal humana é descrita desde a décima terceira semana de idade gestacional (Subotic et al., 1984). Células específicas na mácula flava estão envolvidas na produção dos componentes da matriz extracelular (Sato et al., 2005). Em fetos e recém-nascidos não há distinção entre camadas e o ligamento vocal não está definido. (Hirano et al., 1983; Ishii et al., 2000; Hartnick et al., 2005; Sato et al., 2005). Em adultos, a lâmina própria apresenta-se como uma estrutura localizada imediatamente abaixo do epitélio e superficialmente ao músculo vocal composta por uma matriz formada por proteínas extracelulares e demais células dispostas em três camadas com composição histológica distinta (Catten et al., 1998).

As proteínas que compõe a matriz extracelular da lâmina própria são classificadas em proteínas fibrilares e intersticiais. O colágeno e a elastina representam as proteínas fibrilares, responsáveis pela manutenção do arcabouço fibroso da lâmina própria. As proteínas intersticiais, representadas pelos proteoglicanos e glicoproteínas, são responsáveis pelo preenchimento dos espaços entre as fibras colágenas e elásticas (Labat-Robert et al., 1990). Estas proteínas intersticiais apresentam propriedades biomecânicas que determinam as características

oscilatórias das pregas vocais (Gray et al., 1999; Gray, 2000). Frequentemente afetam a viscosidade, quantidade de fluidos, espessura da lâmina própria e muitas vezes, a densidade e o tamanho das fibras colágenas (Pawlak et al., 1996).

As fibras colágenas representam uma família de proteínas que servem primariamente como elemento de suporte na estrutura tecidual e contribuem para a resistência elástica e estabilidade, além de regularem a migração celular e o remodelamento tecidual durante o crescimento, diferenciação, morfogênese e cicatrização tecidual (Myllyharju et al., 2004). Apresentam desta forma um importante papel na fisiologia vocal, proporcionando tensão e maleabilidade adequadas, ajudando a matriz extracelular a funcionar como um coxim estabilizador, refletindo numa vibração adequada das pregas vocais. As fibras estão distribuídas na lâmina própria em três camadas distintas notando-se uma fina camada de colágeno imediatamente abaixo do epitélio (Sato et al., 1998; Hammond et al., 2000; Sato et al., 2002).

A distribuição das fibras colágenas apresenta um arranjo entrelaçado semelhante a uma “cesta de vime” acarretando uma melhora na dinâmica da vibração devido ao deslizamento adequado entre as mesmas (Melo et al., 2003). A densidade relativa destas fibras varia nas camadas da lâmina própria, sendo que alguns autores mostram que a densidade total de colágeno é maior na camada superficial e na camada profunda (Hammond et al., 2000; Hahn et al., 2006; Tateya et al., 2006). Este arranjo estrutural possui forte impacto na fonação (Melo et al., 2003).

Existem vários subtipos de colágenos fibrilares que apresentam funções específicas (Tateya et al., 2007). O colágeno tipo I apresenta-se em maior quantidade formando “pacotes” que proporcionam uma estrutura com boa resistência elástica. O colágeno tipo III está presente na maioria dos tecidos que requerem flexibilidade e

elasticidade. Tanto o colágeno tipo I quanto o colágeno tipo III são identificados por meio de estudo imunistoquímico sendo considerados os maiores colágenos na lâmina própria da prega vocal humana (Hahn et al., 2005; Hahn et al., 2006).

Os proteoglicanos, representando as proteínas intersticiais da matriz extracelular, são considerados um dos seus principais componentes e fazem parte de uma família de macromoléculas compostas por uma proteína central com cadeias laterais de polissacarídeos sulfatados e glicosaminoglicanas covalentemente ligadas (Iozzo et al., 1998). As glicosaminoglicanas consistem numa estrutura repetida de dissacarídeos sulfatados que representam o principal carboidrato constituinte dos proteoglicanos (Hardingham et al., 1992); propiciam suporte no crescimento ou função supressiva, modulam os reparos teciduais e o crescimento. Os proteoglicanos estão envolvidos na manutenção das propriedades biofísicas de vários tecidos e apesar de serem considerados inicialmente como constituintes inertes do tecido conectivo, participam de interações biológicas relacionadas à organização das fibras colágenas (Wiberg et al., 2002), ao balanço hídrico tecidual e à migração celular (Saika et al., 2000). Atuam também em relação à proliferação e diferenciação celular (Zhang et al., 1998).

Vários proteoglicanos são identificados na matriz extracelular, presentes na superfície ou no interior das células. O versican é um grande proteoglicano *chondroitin* sulfato isolado da cultura de fibroblastos humanos, com uma proteína central rica em ácido glutamínico, serina e resíduos de treonina com múltiplos sítios específicos de ligação (Figura 1). Foi nomeado como *Versatile Proteoglican* devido sua versatilidade e importância na interação com o ácido hialurônico formando estruturas complexas no tecido conjuntivo. Uma destas proteínas, o grande

proteoglicano versican, tem a habilidade de regular o conteúdo de água nos tecidos afetando desta forma sua elasticidade (Iozzo, 1998; Hardingham et al., 1992), e está presente na prega vocal de adultos sendo considerado um dos principais componentes da matriz extracelular (Pawlak et al., 1996; Gray et al., 1999; Hahn et al., 2005). Frequentemente interage com a deposição de colágeno regulando a fibrilogênese (Gray et al., 1999; Hahn et al., 2005; Iozzo, 1998).

Compreendemos desta forma que os componentes da matriz extracelular apresentam grande importância na fisiologia vocal sendo necessário um conhecimento adequado dos mesmos. Considerando que a distribuição dos colágenos e do versican possa variar dentro da lâmina própria da prega vocal e que cada camada possa ser submetida a diferentes mecanismos de estresse durante a fonação ou mesmo antes do início da fonação, propusemos a elaboração deste estudo numa população fetal e adulta para avaliação dos mesmos.

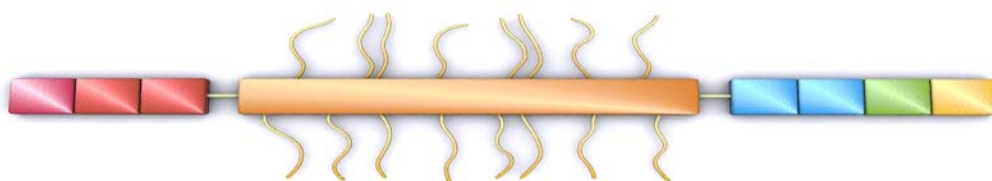


Figura 1. Representação gráfica esquemática do proteoglicano versican. Proteína central (laranja) com glicosaminoglicanas ligadas; cadeias laterais com diversos sítios de ligação (vermelho: ácido hialurônico; azul: fator de crescimento epidérmico; verde: lecitina; amarelo: complemento regulador de proteína).

1.1 OBJETIVOS

GRUPO FETAL

1. Analisar a presença e a distribuição das fibras colágenas na lâmina própria da prega vocal humana de fetos através do método da Pricosirius polarização.
2. Analisar a presença e distribuição do proteoglicano versican na lâmina própria da prega vocal humana de fetos por meio de método imunistoquímico.

GRUPO ADULTO

1. Analisar a distribuição do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria da prega vocal humana de adultos por meio de método imunistoquímico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FIBRAS COLÁGENAS

Montes (1996) descreve técnicas de identificação das fibras elásticas e colágenas através de métodos histoquímicos confirmados por microscopia eletrônica mostrando que, no caso do colágeno, cada tipo apresenta sua própria estrutura química com propriedades funcionais e interações específicas com os componentes da matriz extracelular. Descreve também que o colágeno tipo III deposita-se nos processos cicatriciais e nas fibroses em geral, assim como no desenvolvimento fetal, sendo mais tarde substituído pelo colágeno tipo I nas regiões sujeitas a grandes tensões.

Junqueira, Carneiro (2000) descrevem que os colágenos tipo I e tipo III formam fibras e são chamados do “tipo fibrilar” sendo que no colágeno tipo III estas fibrilas se agrupam formando delgadas fibras chamadas reticulares com 1-4 μm de diâmetro e visíveis ao microscópio óptico. No colágeno tipo I o processo progride formando fibras mais espessas que frequentemente se associam e formam feixes de fibras com até 20 μm de diâmetro constituindo o que habitualmente se chama de fibras de colágeno.

Alberts et al. (2002) mostram a existência de mais de 20 tipos diferentes de colágeno. Diferenciam os colágenos que formam fibrilas dos que formam fibras e dos que se associam aos colágenos fibrilares.

2.2 PROTEOGLICANOS

Ruoslahti (1988) descreve que os proteoglicanos são estruturas moleculares compostas por cadeias de glicosaminoglicanas ligadas covalentemente a uma cadeia central de proteína.

McCarthy et al. (1989) demonstram que os proteoglicanos estão relacionados a uma variedade de processos metabólicos celulares tais como: adesão celular, migração celular, regulação de fatores teciduais de crescimento, regulação de fatores imunológicos, ligação com proteínas plasmáticas e controle de trombogênese.

Laurent e Fraser (1992) descrevem que a estrutura formada entre o proteoglicano versican e o ácido hialurônico forma uma molécula estável e com alto grau de hidratação podendo ser um fator de inibição na interação célula-matriz afetando o turgor, dissipando o impacto e aliviando o estresse da compressão na lâmina própria da prega vocal durante a fonação.

Lander (1993) descreve que as glicosaminoglicanas são polímeros lineares e compõe o grupo do *Keratan* sulfato, condroitina, *dermatan* sulfato, *heparan* sulfato. O ácido hialurônico difere das outras glicosaminoglicanas porque não está ligado covalentemente à proteína.

Nietfeld (1993) descreve os três subgrupos identificados representando as grandes famílias de proteoglicanos: 1) pequeno, intersticial, proteoglicanos da matriz - decorina, *biglican* e fibromodulina; 2) grande, proteoglicanos de agregação *chondroitin* sulfato - *agregan* e versican; 3) *heparan* sulfato. Esta classificação é baseada na similaridade entre o núcleo protéico e a cadeia de glicosaminoglicanas.

Zimmerman (1993) demonstra a interação do proteoglicano versican com o ácido hialurônico. A estrutura molecular do versican inclui uma área de ligação com o ácido hialurônico e sua atividade parece estar relacionada com a atividade do ácido na matriz extracelular.

Iozzo (1998) descreve o versican como um proteoglicano grande e com capacidade de agregação.

Huang et al. (1999) demonstram o predomínio do proteoglicano versican na camada subepitelial da parede da via aérea em grupo de pacientes asmáticos e nos pacientes saudáveis também. A deposição de proteoglicanos mostrou-se maior em pacientes asmáticos podendo estar relacionado com a maior imunoreatividade deste grupo sugerindo um modelo de remodelação da via aérea.

Butler et al. (2001) observam alterações relacionadas ao sexo na distribuição do ácido hialurônico mostrando que no sexo feminino há uma quantidade menor na região mais superficial da lâmina própria e uma quantidade maior na região profunda da lâmina própria enquanto no sexo masculino a distribuição é constante em toda extensão da lâmina própria.

Miserocchi et al. (2001) mostram que o proteoglicano versican está envolvido na formação de edema pulmonar intersticial.

Kielty et al. (2002) demonstram que o proteoglicano versican interage com a rede de fibras elásticas.

Skandalis et al. (2004a) estudando os componentes da matriz extracelular mostram uma quantidade absoluta maior do proteoglicano *agrecan*. Em relação ao versican os autores relatam sua presença na cartilagem laríngea em menor quantidade.

Skandalis et al. (2004b) descrevem a relação dos proteoglicanos com o crescimento e a progressão de tumores malignos. Houve decréscimo do *agrecan*, mas acúmulo de versican e decorina no estroma tumoral associado. A quantidade absoluta dos proteoglicanos diminuiu principalmente devido ao proteoglicano *agrecan*.

2.3 ULTRAESTRUTURA DA PREGA VOCAL HUMANA EM FETOS

Kurita (1980) demonstra alterações progressivas na composição da porção média da lâmina própria da prega vocal humana durante o desenvolvimento fetal. Com 13 semanas de idade gestacional a lâmina própria consiste basicamente de células mesenquimais em toda sua espessura. A partir de 16 semanas começam a aparecer algumas fibras finas com distribuição paralela à borda livre juntamente com as células mesenquimais. Com 23 semanas as fibras colágenas podem ser identificadas e apresentam-se distribuídas numa camada única em toda a espessura da prega vocal.

Hirano et al. (1983) relatam a importância do estudo dos componentes da matriz extracelular e sua distribuição na lâmina própria da prega vocal fetal relacionando os achados com possíveis mudanças teciduais induzidas pela fonação.

Subotic et al. (1984) descrevem a lâmina própria da prega vocal de fetos humanos a partir da décima terceira semana de idade gestacional. Relatam que o desenvolvimento tecidual da prega vocal difere do desenvolvimento tecidual de outras regiões da laringe e faringe sendo mais complexo e seguindo padrões específicos. Sugerem que determinadas células na mácula flava são programadas

para influenciar o desenvolvimento e organização do tecido conectivo na lâmina própria.

Vecerina-Volic et al. (1988) descrevem que a mácula flava é composta por um grande número de células imaturas que participam na produção e organização do tecido conectivo em laringes fetais. Sugerem que a maturação da função fonatória não estaria relacionada somente ao desenvolvimento do sistema nervoso central, mas também relacionada à maturação dos componentes do tecido conectivo.

Campos Bañales et al. (1995) estudando fetos de 24 a 32 semanas de idade gestacional descrevem a importância das máculas flavas no desenvolvimento de toda a estrutura da prega vocal.

Sato et al. (1995) descrevem as máculas flavas de fetos em idade gestacional avançada. Relatam a presença abundante de fibroblastos nesta região sendo responsáveis pela produção de fibras elásticas e colágenas. Sugerem que a mácula flava apresenta importante papel no crescimento e desenvolvimento do ligamento vocal.

Hirano et al. (1999) através de microscopia eletrônica de transmissão, relatam que os fibroblastos na mácula flava de fetos em idade gestacional avançada possuem forma estrelada e são ativos na produção de fibras colágenas e elásticas.

Ishii et al. (2000) descrevem através de microscopia eletrônica de varredura que as pregas vocais de neonatos e de fetos esboçam a organização de duas regiões distintas na lâmina própria não apresentando porém, uma estrutura que possa ser considerada como ligamento vocal. Sugerem que a organização e maturação das estruturas da matriz extracelular estariam relacionadas à função fonatória durante a adolescência.

Sato et al. (2001) através de microscopia óptica e eletrônica, descrevem a ausência de estruturas que possam corresponder ao ligamento vocal em pregas vocais de fetos e recém-nascidos.

Sato et al. (2005) descrevem a existência de células específicas na mácula flava em fetos que, apesar de serem imaturas, já respondem pela produção inicial de componentes da matriz extracelular e que são essenciais na manutenção das propriedades viscoelásticas da mucosa da prega vocal.

Hartnick et al. (2005) estudam a maturação da prega vocal infantil encontrando uma distribuição monolaminar das fibras colágenas ao nascimento com esparsas fibras reticulares entremeadas por células de grade densidade.

2.4 ULTRAESTRUTURA DA PREGA VOCAL HUMANA EM ADULTOS

Hirano (1974) descreve a estrutura da prega vocal que apresenta duas camadas: músculo mais ligamento vocal e mucosa. Relaciona os achados histológicos à produção vocal.

Hirano (1975) revisando dados sobre a estrutura da prega vocal, conclui que esta é composta por cinco camadas: epitélio de revestimento, lâmina própria com camada superficial, intermediária e profunda e músculo vocal. A camada superficial, também chamada de espaço de Reinke, é formada por tecido conjuntivo frouxo e flexível; a camada intermediária é constituída principalmente por fibras elásticas; a

camada profunda apresenta predomínio de fibras colágenas. As duas últimas camadas formam o ligamento vocal.

Hirano (1981) descreve detalhadamente a distribuição dos componentes das camadas apresentadas em seus estudos anteriores. Na camada superficial há predomínio de fibras colágenas finas formando uma trama frouxa. Na camada intermediária há predomínio de fibras elásticas que se entrelaçam com algumas fibras colágenas. Na camada profunda predominam as fibras colágenas numa disposição mais densa em relação à camada superficial. As fibras colágenas estão dispostas paralelamente ao bordo livre da prega vocal.

Hirano e Kakita (1985) estudam o comportamento vibratório das pregas vocais formulando a teoria de corpo e cobertura onde as cinco camadas descritas em estudos anteriores são divididas agora em três regiões denominadas: cobertura, composta por epitélio e camada superficial da lâmina própria; região de transição correspondendo à camada intermediária e profunda da lâmina própria; corpo, correspondendo ao músculo vocal. A teoria baseia-se na movimentação da região flexível (cobertura) sobre o corpo relativamente fixo.

Labat-Robert et al. (1990) descrevem que a matriz extracelular é composta por duas famílias de macromoléculas denominadas colágeno e elastina. Estas fibras são responsáveis pelo arcabouço fibroso da lâmina própria das pregas vocais. Os proteoglicanos e as glicoproteínas estruturais são as substâncias do interstício e preenchem os espaços disponíveis entre as fibras do arcabouço.

Gray (1991) detalha a zona de membrana basal na qual o epitélio da prega vocal humana é ancorado na lâmina própria.

Gray et al. (1993) realizam estudo sobre as fibras colágenas, mostrando o predomínio do colágeno tipo III na lâmina própria da prega vocal.

Gray et al. (1994) descrevem as fibrilas de ancoragem, compostas por colágeno tipo VII, unindo a membrana basal e as fibras colágenas da camada superficial da lâmina própria.

Sato e Hirano (1995) descrevem a estrutura da mácula flava concluindo estarem relacionadas ao desenvolvimento da prega vocal. Os fibroblastos que compõe as máculas, localizadas nas extremidades anterior e posterior da prega vocal, produzem e remodelam as fibras elásticas e colágenas. Aparentemente há uma diminuição das atividades fisiológicas com o envelhecimento.

Ishii et al. (1996) descrevem a ultraestrutura da lâmina própria da prega vocal humana através de microscopia eletrônica de varredura. As fibras colágenas apresentam-se como estruturas finas formando uma trama frouxa na camada superficial. Na camada intermediária e profunda apresentam-se como fibras grossas numa trama mais densa.

Pawlak et al. (1996) sugere que mudanças ocorridas nos componentes da matriz extracelular seriam responsáveis pelo surgimento de lesões laríngeas benignas. Destacam a importância da contribuição de cada componente da matriz extracelular neste processo, pois devido à baixa celularidade da lâmina própria os componentes extracelulares são determinantes no comportamento bioquímico. Descrevem que a matriz extracelular é composta por duas famílias de macromoléculas: uma responsável pelo arcabouço fibroso composto por colágeno e elastina e outra família composta por substâncias de preenchimento que são os proteoglicanos e as glicoproteínas. Descrevem que o proteoglicano versican possui

capacidade de ligação com o ácido hialurônico promovendo a possibilidade de preenchimento de espaços devido a sua intensa ligação e organização com as moléculas de água.

Sato e Hirano (1997) descrevem a microcirculação na lâmina própria da prega vocal humana.

Catten et al. (1998) descrevem as estruturas celulares da lâmina própria com ênfase aos fibroblastos que se distribuem em todas as camadas, mas com predomínio na camada profunda.

Milutnovic et al. (1998) descrevem que os componentes da matriz extracelular em adultos (células epiteliais, tecido conjuntivo e músculo) estão posicionados paralelamente à borda livre da prega vocal formando um mecanismo adaptado à fonação.

Sato (1998) descreve a presença de fibras reticulares nas camadas superficial e intermediária da lâmina própria, sendo mais abundantes próximo à borda livre diminuindo progressivamente nas porções superior e inferior da prega vocal. Descreve também que as fibras reticulares são delgadas e não formam feixes, mas são ramificadas e se agrupam numa delicada rede tridimensional.

Gray et al. (1999) discorrem sobre os componentes da matriz extracelular com especial atenção as proteínas fibrosas. Descrevem sobre a divisão dos proteoglicanos em grupos, dando ênfase na descrição do grupo denominado de grande proteoglicano com tendência à agregação, como *agrecan* e *versican*. Descrevem também o ácido hialurônico e ressaltam que este componente não está ligado covalentemente à proteína sendo então considerado um grupo separado e único de proteoglicano. Descrevem também a participação do ácido hialurônico na

determinação da viscosidade tecidual. Concluem que estudos futuros são necessários na busca de proteínas com interesse terapêutico

Hirano et al. (1999) descrevem os componentes da mácula flava demonstrando serem os fibroblastos os responsáveis pela síntese das proteínas da lâmina própria.

Gray et al. (2000) descrevem a composição molecular da matriz extracelular da lâmina própria das pregas vocais demonstrando a participação de proteínas fibrosas na fisiologia tecidual envolvida no processo vibratório durante a fonação.

Hammond et al. (2000) relatam a importância do colágeno na biomecânica da fonação analisando de forma quantitativa às alterações relacionadas ao sexo e a idade na distribuição das fibras colágenas. Os resultados mostram uma similaridade na distribuição do colágeno na lâmina própria da prega vocal com maior quantidade na região mais profunda seguida pela região mais superficial e intermediária; mostram também um aumento na concentração de colágeno nos grupos criança e adulto sem diferença entre os grupos adulto e idoso. Há diferença entre os sexos no grupo adulto e no grupo idoso com uma quantidade maior de colágeno nos homens.

Paulsen et al. (2000) descrevem o colágeno tipo I e colágeno tipo III nas máculas flavas e nas regiões de inserção do ligamento vocal.

Sato et al. (2001) descrevem um tipo especial de fibroblasto, as células estreladas, responsáveis pela produção de fibras elásticas, colágenas e glicosaminoglicanas, estando presente na mácula flava e não no espaço de Reinke.

Sato et al. (2002) publicam um estudo sobre as alterações das fibras colágenas relacionadas com o envelhecimento realizando, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica, uma comparação entre laringes de um grupo de idosos e de

adultos jovens. São relatadas alterações tais como: aumento da quantidade de fibras colágenas e diminuição da quantidade de fibras reticulares, principalmente em laringes do sexo masculino; formação de feixes de fibras colágenas com densidade maior; diminuição dos espaços entre as fibras colágenas e outras estruturas da matriz extracelular.

Melo et al. (2003) identificam através do método da Picrosirius polarização duas populações distintas de fibras colágenas sugerindo serem fibras colágenas do tipo I e do tipo III. Descrevem um arranjo peculiar na distribuição espacial destas fibras sendo denominado como arranjo em “cesta de vime”. O suposto colágeno tipo I, com fibras mais grossas, apresenta predomínio nas camadas superficial e profunda sendo que na camada superficial apresenta-se com uma distribuição imediatamente abaixo do epitélio enquanto na camada profunda apresenta-se numa organização mais densa e com ramificações para o músculo vocal. Na camada intermediária são observadas fibras colágenas mais finas e de aspecto delicado, formando uma trama mais aberta e com uma densidade menor em relação às demais camadas. As fibras desta região intermediária são sugeridas como sendo fibras colágenas do tipo III.

Sato et al. (2003) descrevem um tipo celular específico de fibroblastos denominado células estreladas, que estão presentes na mácula flava das pregas vocais e estão relacionadas com os processos metabólicos da matriz extracelular da lâmina própria.

Ximenes et al. (2003) estudando as alterações laríngeas relacionadas com a idade observam uma redução progressiva da celularidade epitelial e da espessura da lâmina própria da prega vocal com o decorrer dos anos sugerindo implicações na fisiologia vocal.

Hahn et al. (2005) através de estudo imunoistoquímico, estudam a concentração de glicosaminoglicanas e glicoproteínas na lâmina própria da prega vocal de humanos, cães, porcos e furões. A concentração de glicosaminoglicanas sulfatadas na lâmina própria humana mostrou-se similar à derme. Comprovam uma diferença na distribuição entre as diferentes espécies. O versican esta presente na matriz extracelular da lâmina própria de todas as espécies com tendência a maior expressão na porção superior da camada intermediária em humanos. É sugerida uma relação com a formação do edema de Reinke bem como uma participação na formação de edema pulmonar.

Hahn et al. (2006a) comparam a quantidade de elastina e ácido hialurônico na lâmina própria de pregas vocais humanas, caninas, de furões e de porcos. Concluem que a quantidade de elastina é duas vezes maior na lâmina própria que na derme enquanto o ácido hialurônico apresenta quantidade similar.

Hahn et al. (2006 b) mantém a seqüência de investigação das estruturas da matriz extracelular das pregas vocais por meio de métodos imunoistoquímicos descrevendo que a quantidade de colágeno na lâmina própria humana representa por volta de 70% da quantidade encontrada na derme. A quantidade de colágeno na lâmina própria dos cães é similar aos humanos porém, a distribuição que mais se assemelha aos humanos é a dos porcos.

Tateya et al. (2006) mostram num estudo descritivo que o padrão de distribuição das fibras colágenas é semelhante em todas as pregas vocais sem diferença entre os sexos. O colágeno tipo III apresenta distribuição homogênea em toda a prega vocal sem distinção entre camadas, sugerindo que esta maior quantidade de colágeno ajudaria na manutenção da estrutura da lâmina própria e permitindo que

o tecido tenha elasticidade e flexibilidade adequadas para a sua função. O colágeno tipo I apresentou maior expressão na camada superficial, principalmente abaixo da membrana basal e na também na camada profunda.

Tateya et al. (2007) continuando os estudos dos componentes fibrosos da matriz extracelular descrevem a ultraestrutura das fibras colágenas, reticulares e elásticas. À microscopia eletrônica mostra que as fibras colágenas e reticulares são compostas de fibrilas de colágeno. Os resultados mostram que as partículas tipo III são abundantes nas fibrilas das fibras colágenas enquanto partículas tipo I são esparsas; as fibras reticulares são compostas por ambas as partículas tipo I e tipo III mostrando que as fibras tipo I e III coexistem nas fibras colágenas e reticulares.

3. MÉTODOS

3.1 ASPECTO ÉTICO

O projeto de pesquisa foi aprovado sob o protocolo de número 279/04, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.2 GRUPO FETAL

3.2.1 CASUÍSTICA

As laringes humanas foram obtidas de fetos natimortos submetidos à necropsia no Serviço de Verificação de Óbitos da Capital (SVOC). Foram incluídas neste estudo sete laringes fetais, três do sexo feminino e quatro do sexo masculino. A média de idade foi de 31 semanas, variando de 28 a 36 semanas de idade gestacional. Os fetos não apresentavam malformações nem anormalidades macroscópicas na laringe. Foram incluídos somente casos submetidos à necropsia dentro de 24 horas após a morte.

Informações relativas ao feto e a mãe foram obtidas junto ao prontuário do SVOC.

3.2.2 ISOLAMENTO DA PREGA VOCAL

As laringes fetais excisadas foram dissecadas no Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP (LIM 32), com remoção das partes moles adjacentes e isolamento do arcabouço laríngeo. Realizou-se uma incisão longitudinal posterior entre as cartilagens aritenóides para abertura da peça e exérese em bloco da prega vocal, cartilagem aritenóide e cartilagem tireóide da hemilaringe direita. A prega vocal direita foi então dissecada e isolada entre a comissura anterior e o processo vocal da cartilagem aritenóide e enviada para preparação histológica após identificação pelo número da necropsia do SVOC.

3.2.3 HISTOLOGIA

Foram realizados cortes coronais de 5mm de espessura na região média da porção membranosa da prega vocal direita. Os fragmentos obtidos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% por 24 horas. Após a fixação, foram desidratados em concentrações alcoólicas progressivas e embebidos em parafina. Os blocos foram submetidos a cortes histológicos de 4 µm de espessura e corados pela Hematoxilina - Eosina (HE) para identificação inicial das estruturas e camadas da prega vocal.

3.2.3.1 FIBRAS COLÁGENAS

Para a visualização das fibras colágenas os cortes histológicos foram corados através do método da Picrosirius polarização. Neste método, os cortes histológicos

são inicialmente “desparafinados”, hidratados e então corados por uma hora numa solução de 0,1 % de Sirius Red (Sirius Red F 3B 200, Mobay Chemical Co., Union, NJ, EUA) dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Os cortes são lavados por cinco minutos em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Harris por dois minutos. As lâminas são observadas sob microscopia de luz normal e sob luz polarizada sendo que as fibras colágenas são identificadas por coloração que varia entre o verde e o vermelho (Junqueira et al., 1979).

3.2.3.2 PROTEOGLICANO VERSICAN

Para a análise da expressão do proteoglicano versican as reações foram realizadas usando-se anticorpo monoclonal anti-humano.

Cortes histológicos em lâminas previamente preparadas com *silane* foram incubados em solução de condroitinase ABC (Sigma-Aldrich®, Oakville, ON, Canadá) a 0,05 U/ml por uma hora a 37°C e então incubados com o anticorpo primário (anticorpo monoclonal anti-humano IgG1, 270428-1, Seikagaku América, Inc; Rockville, MD, EUA) com diluição de 1:500 em 1% de BSA/PBS entre 4 e 8°C por uma noite. Como anticorpo secundário foi utilizado o LSAB+Ap (Dako®, Carpinteria, CA, EUA) e Fast Red (Sigma-Aldrich®, Oakville, ON, Canadá) como cromógeno. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Incubação com PBS, associado ao BSA 1% ao invés do anticorpo primário, foi utilizado como controle negativo.

3.2.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas e do proteoglicano versican foi seguida uma distribuição espacial dentro da lâmina própria conforme modelo proposto por Butler et al., (2001). Qualitativamente, foram avaliadas as características ultraestruturais das fibras colágenas. A avaliação quantitativa foi feita através de análise digital de imagens utilizando um sistema composto por um microscópio óptico Leica® DMR (Leica M-System, Wetzlar, Hessen, Alemanha) conectado a um computador pessoal (*desktop*) com processador Intel® Celeron® D 420 e monitor LCD LG®14 através de uma câmera de vídeo (Nikon® modelo NK 657) (Figura 2).

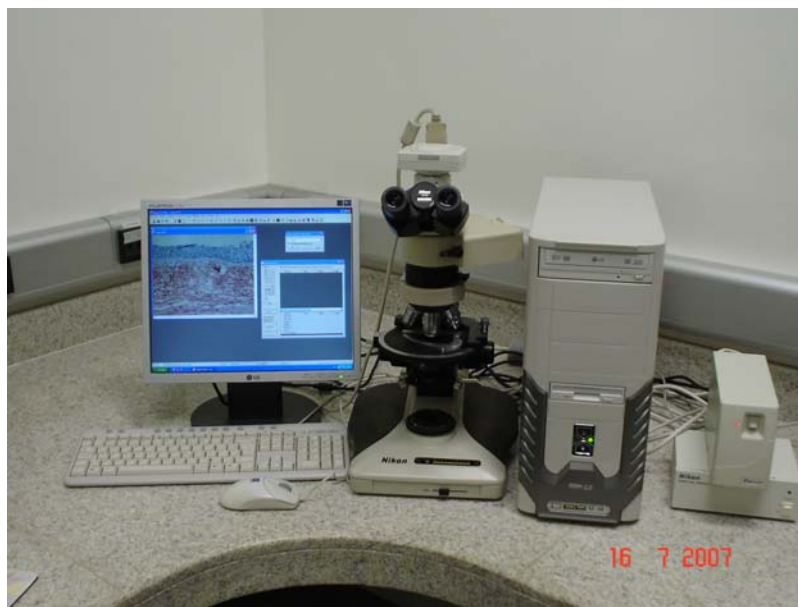


Figura 2. Analisador digital de imagens composto por microscópio óptico equipado com câmera de vídeo acoplado a um monitor e a computador com programa de análise digital de imagens.

Para cada caso foram capturadas três imagens seqüenciais por camada (superficial, intermediária e profunda) representando de forma padronizada a maior extensão possível das mesmas.

As imagens capturadas foram analisadas quanto à densidade de fibras colágenas ou versican (área positiva / área total). A análise das fibras colágenas e do versican foram realizadas em lâminas distintas preparadas especificamente para cada componente a ser estudado. Utilizou-se o software Image Pro Plus® versão 4.1 (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA) seguindo o seguinte procedimento:

- Padronização de positividade – Fotomicrografias representativas dos casos analisados (Figura 3) foram utilizadas para estabelecer um padrão de cores definido como “positivo” por dois patologistas, identificando o que seria reconhecido como fibras colágenas e versican.
- Análise – Em cada foto foi delimitada uma área de interesse, compreendendo a camada em avaliação (Figura 4), e aplicado o padrão de cores previamente estabelecido obtendo-se a quantificação da expressão do marcador denominado “área positiva” (Figura 5). A seguir, a medida total da área de interesse foi obtida (Figura 6) para expressão dos resultados em densidade (área positiva / área total), tanto das fibras colágenas quanto do versican.

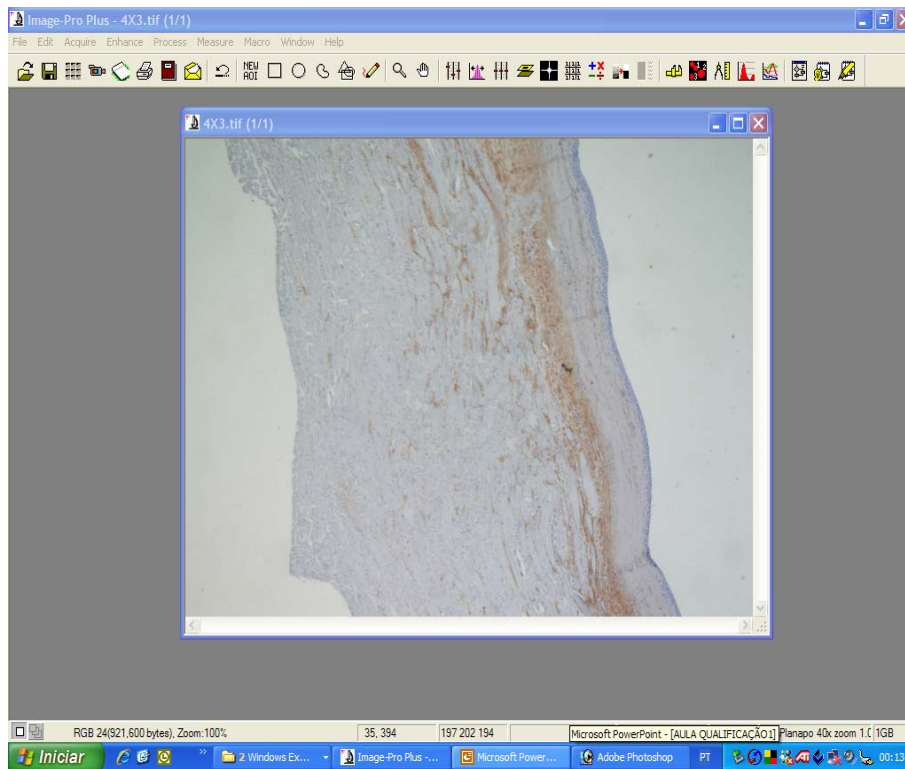


Figura 3. Interface do programa de análise digital de imagem mostrando a fotomicrografia de toda a extensão da prega vocal. (aumento de 50x).

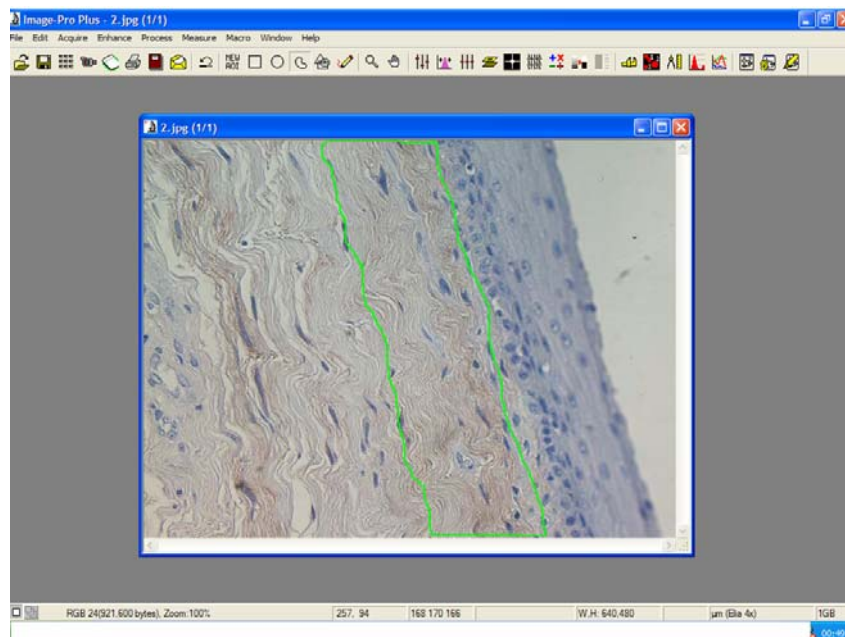


Figura 4. Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área a ser estudada marcada em verde. (aumento de 400x).

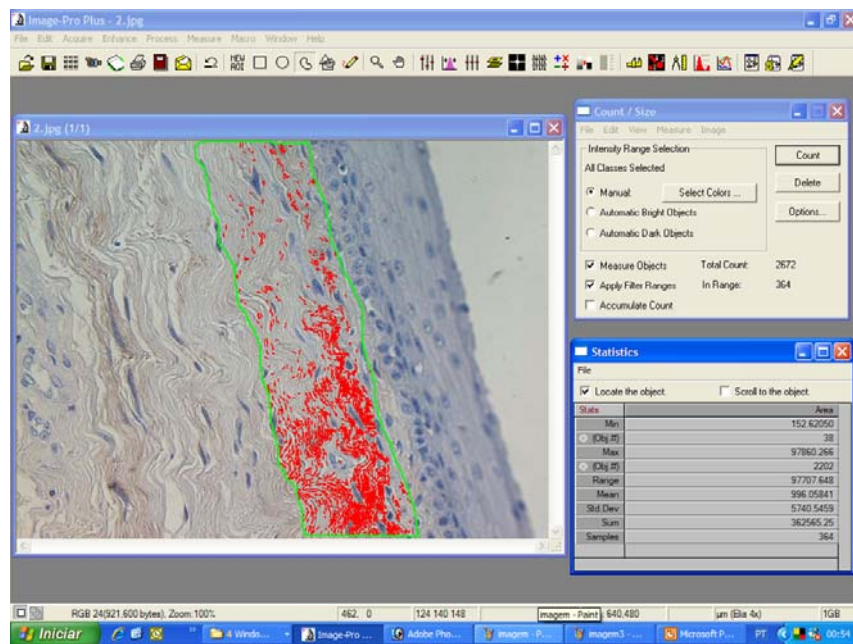


Figura 5. Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área a ser estudada e aplicação do padrão de cores estabelecido (área positiva) marcado em vermelho. (aumento de 400x).

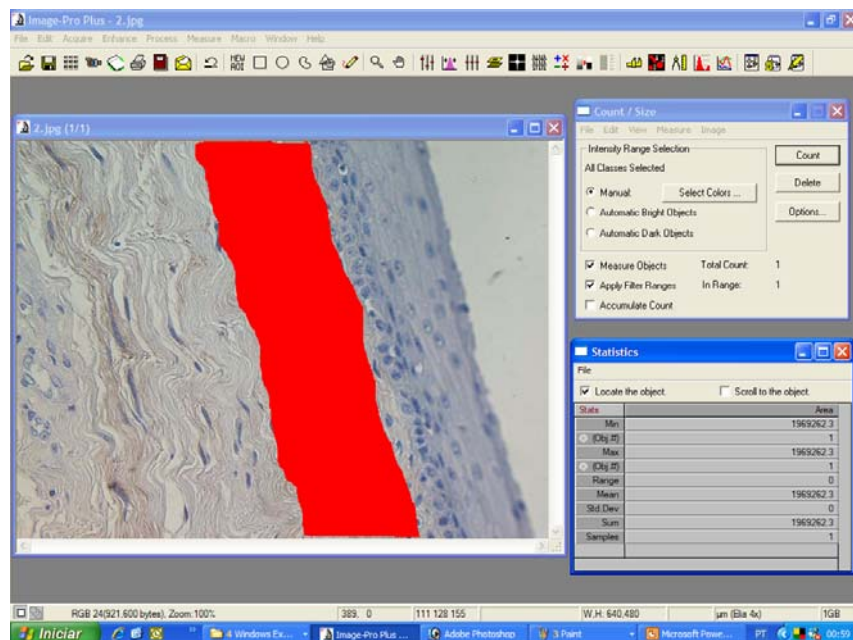


Figura 6. Interface do programa de análise digital de imagem mostrando fotomicrografia com delimitação da área total a ser medida marcada em vermelho. (aumento de 400x).

3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos relacionados às fibras colágenas e ao versican foram expressos em medianas e intervalos mínimo – máximo. Comparação entre as áreas coradas dentro dos três compartimentos foi realizada utilizando-se os testes estatísticos não paramétricos de Friedman e Wilcoxon. Todos os testes foram feitos utilizando-se o software SPSS® versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e os valores de *p* menores que 0,05 foram considerados significantes. Os resultados são expressos em densidade de fibras colágenas e versican.

3.3 GRUPO ADULTO

3.3.1 CASUÍSTICA

Laringes humanas foram obtidas de cadáveres adultos submetidos à necropsia no SVOC dentro de 24 horas após a morte. Foram analisadas 20 laringes (10 homens e 10 mulheres). A média de idade dos cadáveres foi de 67.8 (± 9.4), variando de 50 a 85 anos. A média de idade dos homens foi de 66 anos e das mulheres de 70 anos; as idades foram pareadas (Figura 7). Foram excluídos do estudo cadáveres com história prévia de manipulação cervical como intubação nasal ou oral, traqueostomia, cirurgia laríngea ou irradiação da região da cabeça e do pescoço. Somente laringes de não-fumantes declarados foram incluídas no estudo.

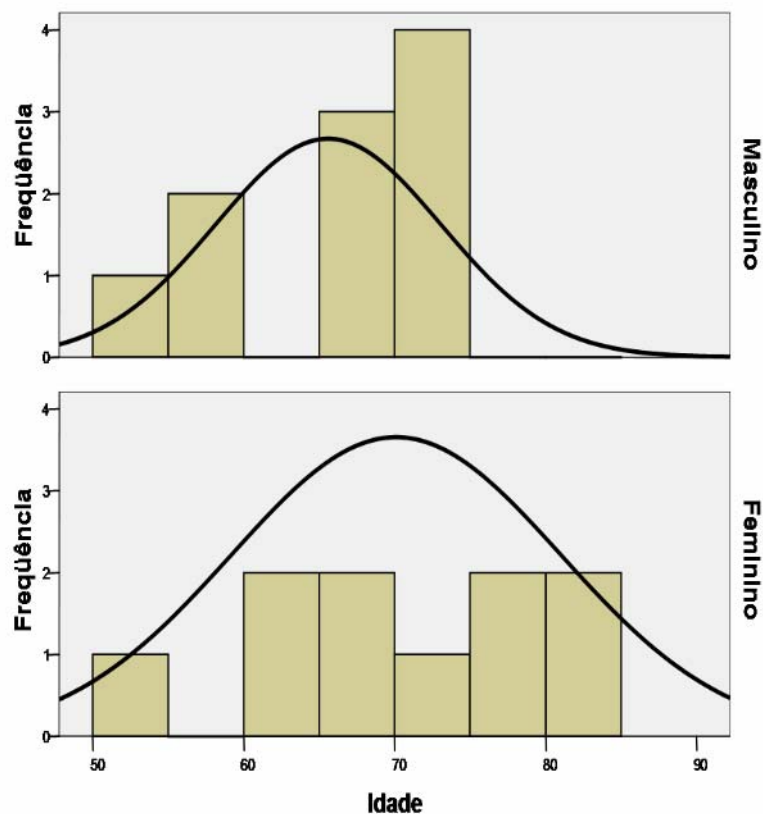


Figura 7. Histograma mostrando a distribuição pareada (curvas similares) das idades nos grupos masculino e feminino permitindo sua comparação.

3.2.2 ISOLAMENTO DA PREGA VOCAL

As laringes foram dissecadas para retirada de partes moles adjacentes, realizada abertura das mesmas pela região posterior e visualização das pregas vocais que não mostraram lesões estruturais macroscópicas. A prega vocal esquerda de cada laringe foi dissecada e fixada em solução de formalina a 10% por 24 horas. Após, foram realizados cortes coronais de 5 mm de espessura na região média da porção membranosa da prega vocal esquerda (Figura 8). O material foi desidratado em concentrações alcoólicas progressivas e colocados em blocos de parafina. Os blocos

foram submetidos a cortes histológicos de 4 μm de espessura e corados pela Hematoxilina-Eosina para análise inicial.

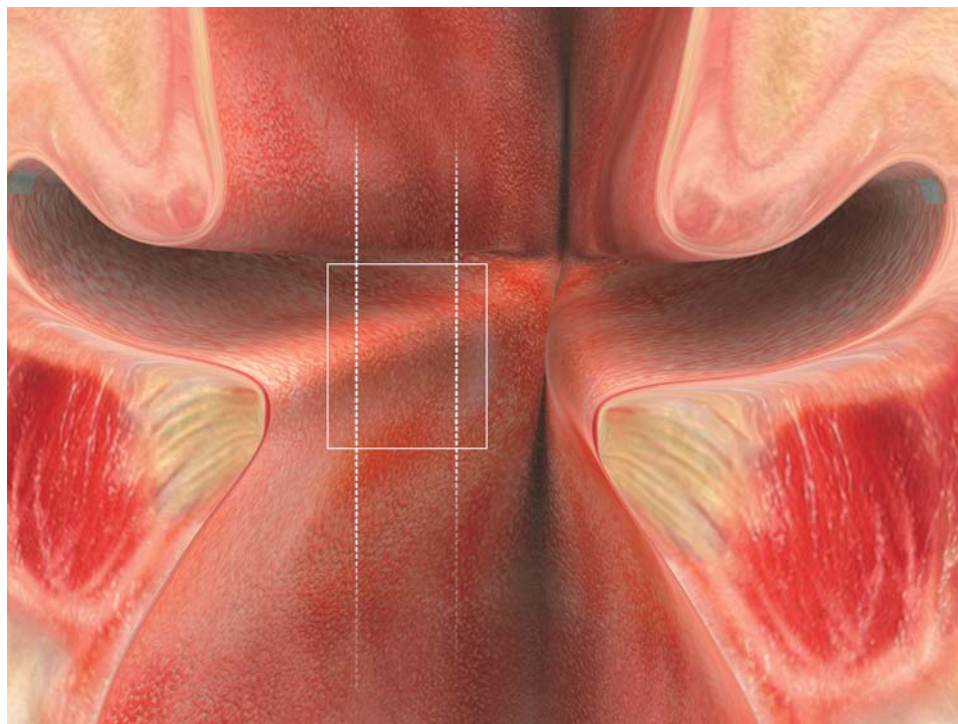


Figura 8. Representação gráfica esquemática da região interna da laringe após incisão longitudinal entre as cartilagens aritenóides (visão posterior). Retângulo representando o local do corte coronal da região média da porção membranosa da prega vocal esquerda.

3.2.3 HISTOLOGIA

3.2.3.1 FIBRAS COLÁGENAS

Para a análise da expressão do colágeno tipo I e do colágeno tipo III foram realizadas reações imunoistoquímicas usando anticorpo monoclonal anti-humano (C7510 12A, United States Biological, Swampscott, MA, USA) com diluição de

1:250 e anticorpo monoclonal anti-humano (CP19L, Calbiochem-Novabiochem, San Diego, CA, USA) com diluição de 1:500, respectivamente.

3.2.3.2 PROTEOGLICANO VERSICAN

Para analisar a expressão do versican foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-humano (Seikagaku America, Inc; Rockville, MD, USA). Para esta reação imunistoquímica as lâminas foram pré-tratadas com solução de condroitinase na concentração de 0.05 U/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canadá), por 1 hora a 37⁰C. Após, as lâminas eram incubadas com anticorpo primário em 1% BSA/PBS entre 4⁰C e 8⁰C durante a noite. Como anticorpo secundário, LSAB+Ap (Dako, Carpinteria, CA, USA) e Fast Red (Sigma, Steinheim, NRW, Germany) foram empregados como cromógenos. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Incubação com PBS, associado ao BSA 1% ao invés do anticorpo primário, foi utilizado como controle negativo.

3.2.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a análise quantitativa da expressão de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican, a lâmina própria foi dividida em três compartimentos (camadas), seguindo o modelo proposto por Butler et al., (2001): superficial, intermediária e profunda. A avaliação quantitativa foi feita através de análise digital de imagens utilizando um sistema composto por um microscópio óptico Leica® DMR (Leica M-System, Wetzlar, Hessen, Alemanha) conectado a um computador pessoal (*desktop*) com

processador Intel® Celeron® D 420 e monitor LCD LG®14 por meio de uma câmera de vídeo (Nikon® modelo NK 657).

Para cada compartimento da lâmina própria foram analisadas três áreas não sobrejacentes em aumento de 400x, compreendendo nove áreas analisadas para cada lâmina. As imagens capturadas foram analisadas quanto à densidade de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican (área positiva / área total) utilizando-se o software Image Pro Plus® versão 4.1 (Media Cybernetics – Silver Spring, MD, USA) seguindo o mesmo procedimento realizado no grupo fetal (Figura 3, 4, 5 e 6).

3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como área positiva / área total ($\mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^2$). Os dados foram expressos como medianas e intervalos mínimo – máximo. As comparações das áreas coradas dentro dos três compartimentos foram realizadas usando os testes ANOVA ou Kruskal-Wallis seguidos de post-hoc Tukey's b ou Bonferroni respectivamente (dependendo da distribuição dos dados). Os dados foram transformados em logarítimos antes da análise no software SPSS® versão 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Correlação entre os elementos da matriz extracelular foi realizada usando o teste de correlação de Spearman. Valores de p menores que 0.05 foram considerados significantes.

4. RESULTADOS

4.1 GRUPO FETAL

As fibras colágenas na lâmina própria da prega vocal humana fetal foram identificadas através do método da Picrosirius polarização (Figura 9 e Figura 10). O método imunoistoquímico para coloração do proteoglicano versican mostra-se viável em laringes fetais estando presente em toda a extensão da lâmina própria. (Figura 11).

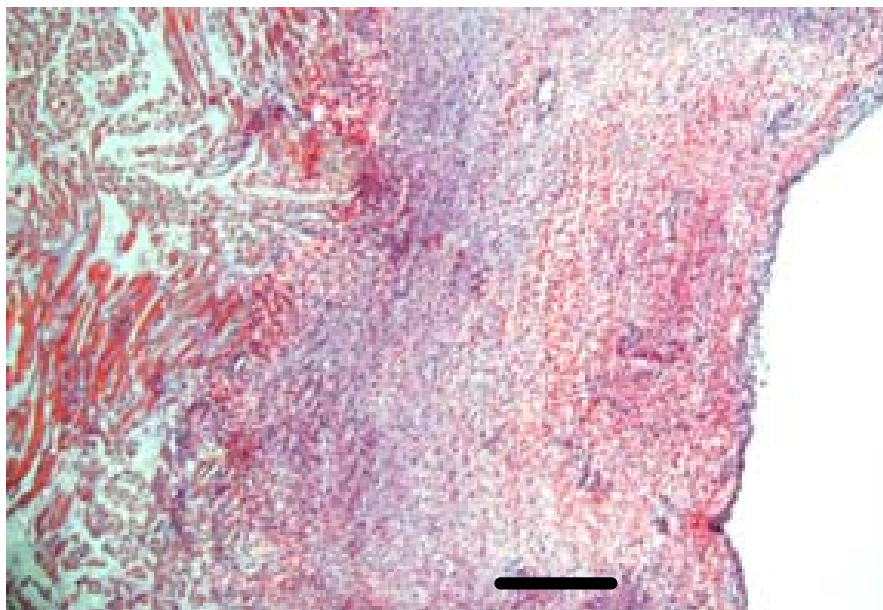


Figura 9. Corte histológico coronal da região média da porção membranosa de prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz convencional. (aumento de 50x) - barra = 400 μ m

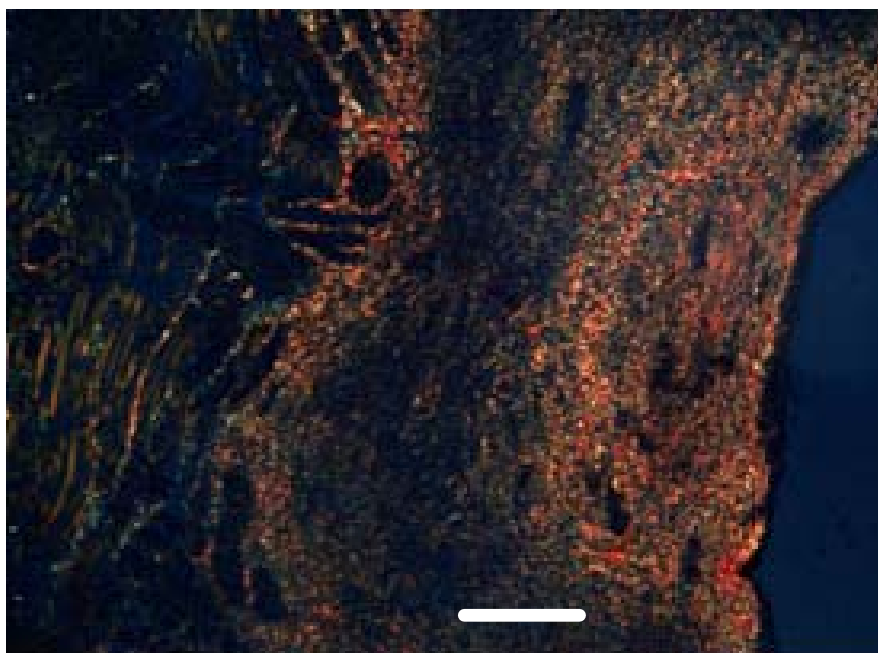


Figura 10. Corte histológico coronal da região média da porção membranosa de prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz polarizada. (aumento de 50x) - barra = 400 μ m

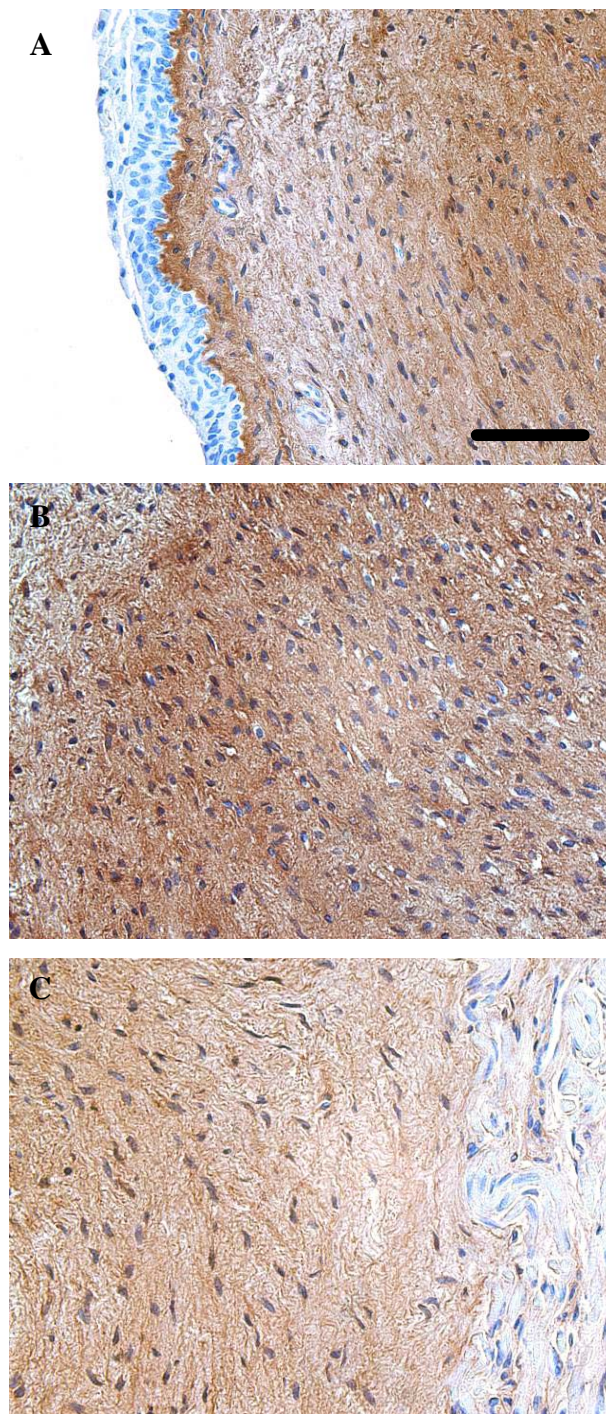


Figura 11. Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada por técnica imunoistoquímica específica para o proteoglicano versican (coloração marron) mostrando sua distribuição nas camadas superficial (A), intermediária (B) e profunda (C) da lâmina própria. (aumento de 200x) – barra = 100 μ m

Os valores das densidades médias de colágeno e versican nas camadas superficial, intermediária e profunda da lâmina própria das laringes fetais estudadas são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Densidade média das fibras colágenas e versican nas camadas da lâmina própria da prega vocal de laringes fetais. S: camada superficial; I: camada intermediária; P: camada profunda

Caso		Fibras Colágenas			Versican		
Sexo	Idade gestacional	S	I	P	S	I	P
F	36 sem	0,6617	0,3966	0,3584	0,2068	0,1986	0,1336
F	29 sem	0,4608	0,2626	0,3809	0,1273	0,1138	0,0903
F	32 sem	0,2537	0,7094	0,6111	0,2477	0,1613	0,1768
M	30 sem	0,7691	0,7395	0,6198	0,2803	0,1435	0,1245
M	31 sem	0,6957	0,7371	0,8139	0,2303	0,2029	0,1572
M	36 sem	0,7034	0,9111	0,7499	0,0485	0,0884	0,0485
M	28 sem	0,6979	0,3722	0,6078	0,3144	0,1709	0,1617

A distribuição das fibras colágenas apresenta-se de forma homogênea em toda a espessura da lâmina própria não havendo diferença estatística ($p=0,56$) na sua distribuição quando dividida entre camadas denominada superficial (S), intermediária (I) e profunda (P) (S=0,69 [0,25-0,77]; I=0,73 [0,26-0,91]; P=0,61 [0,36-0,81]).

O arranjo espacial das fibras colágenas na lâmina própria da prega vocal humana denominado em “cesta de vime” também é observado na lâmina própria da prega vocal de laringes fetais (Figura 12).

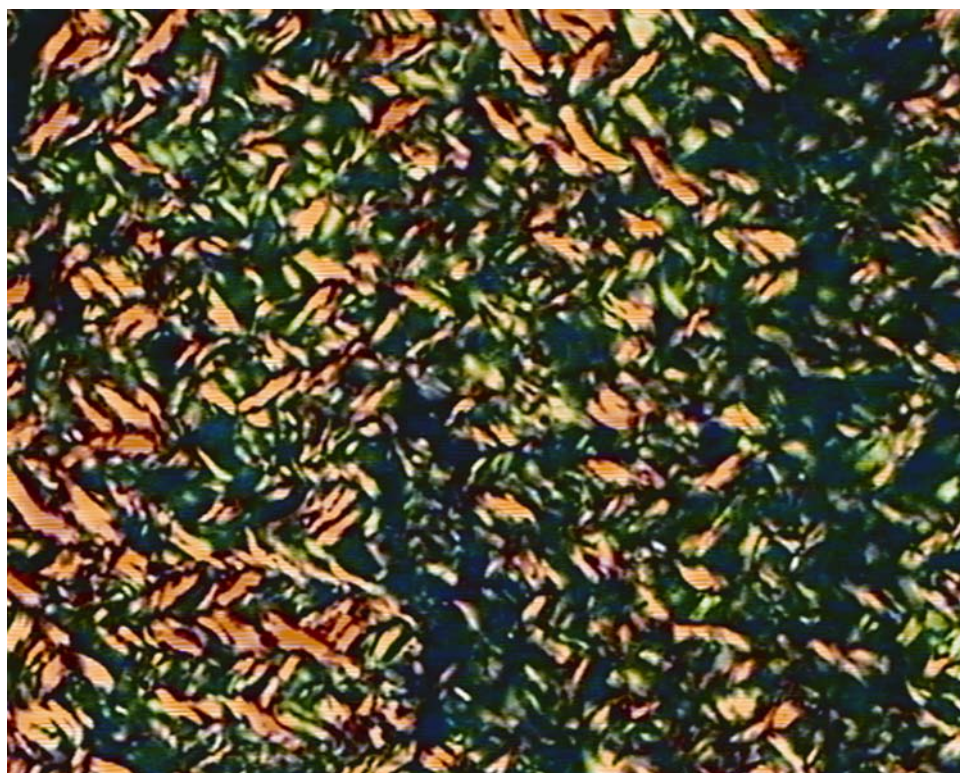


Figura 12. Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada com Picrosirius e visualizada sob luz polarizada mostrando um arranjo espacial em “cesta de vime” das fibras colágenas. (aumento de 400x)

A distribuição do proteoglicano versican apresenta uma diferença significativa entre as camadas da lâmina própria, com uma menor concentração na camada profunda em relação à camada superficial ($P=0,13$ [0,05-0,18]; $S=0,23$ [0,05-0,31], $p=0,043$) e em relação à camada intermediária ($I=0,16$ [0,09-0,20], $p=0,018$), não havendo diferença entre as camadas superficial e intermediária entre si em relação à densidade do versican ($p=0,091$) (Figura 13).

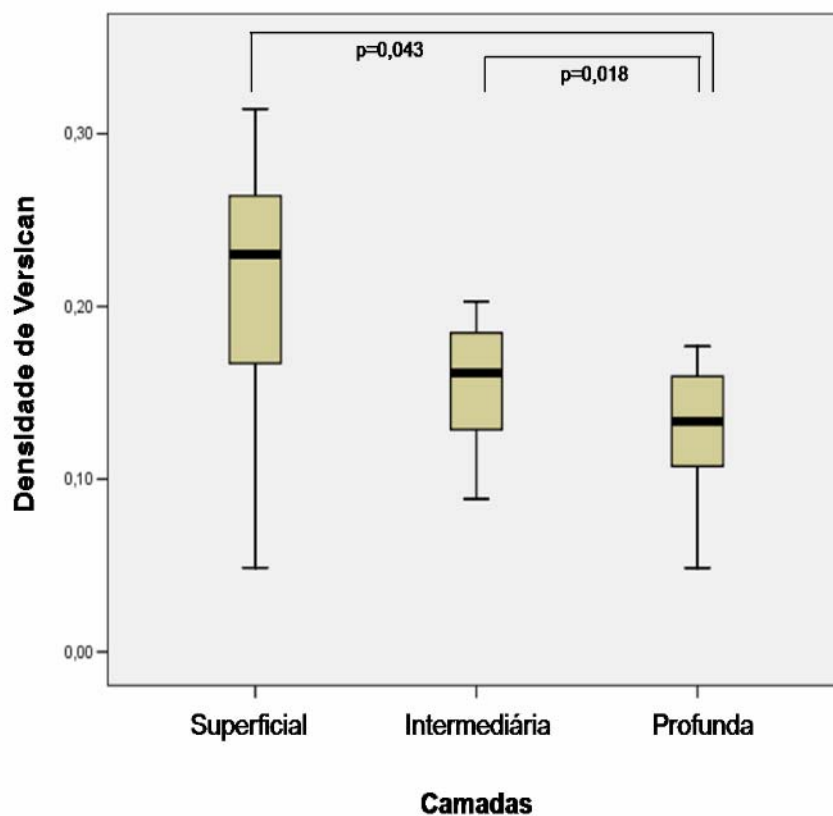


Figura 13. Distribuição da densidade do proteoglicano versican nas camadas laminares da lâmina própria da prega vocal fetal. As linhas representam as medianas e as caixas, o intervalo 25-75%.

Nota-se predomínio do versican na região subepitelial da camada superficial da lâmina própria sem significância estatística (Figura 14).

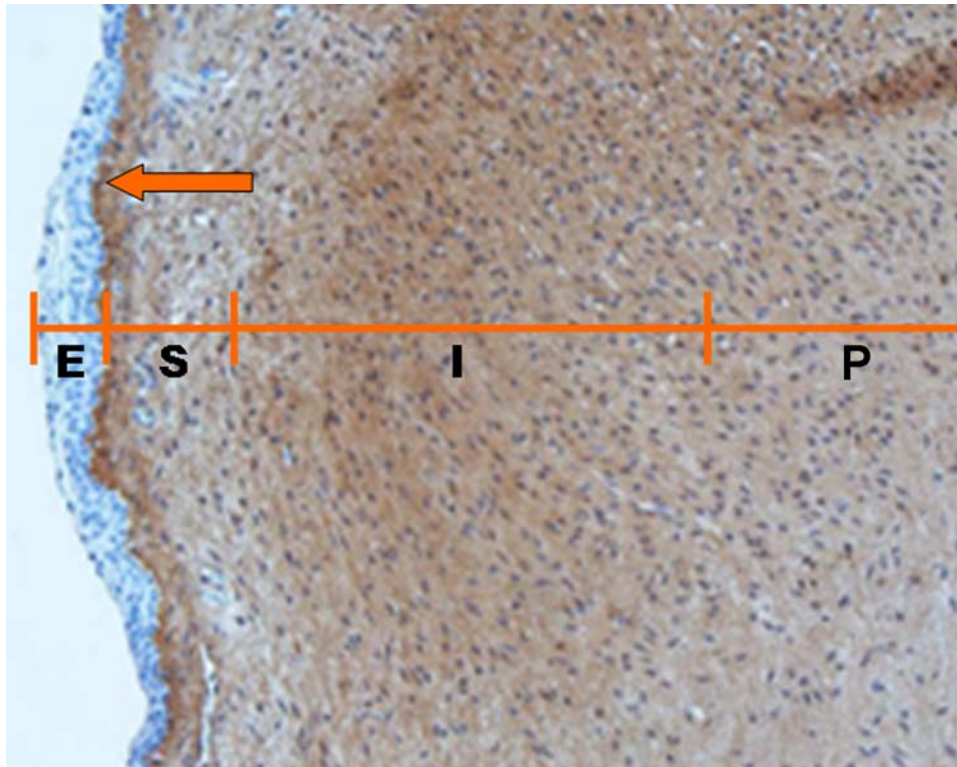


Figura 14. Corte histológico coronal da região média da porção membranosa da prega vocal fetal corada por técnica imunoistoquímica específica para o proteoglicano versican (coloração marron) mostrando seu predomínio na região subepitelial (seta) da camada superficial da lâmina própria. (aumento de 200x). E= epitélio; S= camada superficial; I= camada intermediária; P= camada profunda

A representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas distribuídas na lâmina própria da prega vocal fetal é ilustrada pela Figura 15 e Figura 16.



Figura 15. Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas distribuídas de forma uniforme na lâmina própria (LP) da prega vocal fetal delimitada superiormente pelo epitélio (E) e inferiormente pelo músculo vocal (VM).



Figura 16. Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas na lâmina própria da prega vocal fetal (ampliada em relação à Figura 15) mostrando o entrelaçamento das fibras em arranjo denominado em “cesta de vime”. As fibras de coloração marrom sugerem as fibras de colágeno tipo I e as fibras de coloração verde sugerem fibras de colágeno tipo III.

4.2 GRUPO ADULTO

O colágeno tipo I, o colágeno tipo III e o versican coram-se como estruturas fibrilares na lâmina própria da prega vocal e entre as fibras do músculo vocal.

Nota-se uma menor densidade de colágeno tipo I na camada intermediária (I) quando comparado à camada superficial (S) ($p < 0.001$) e camada profunda (P) ($p = 0.005$) (Figura 17).

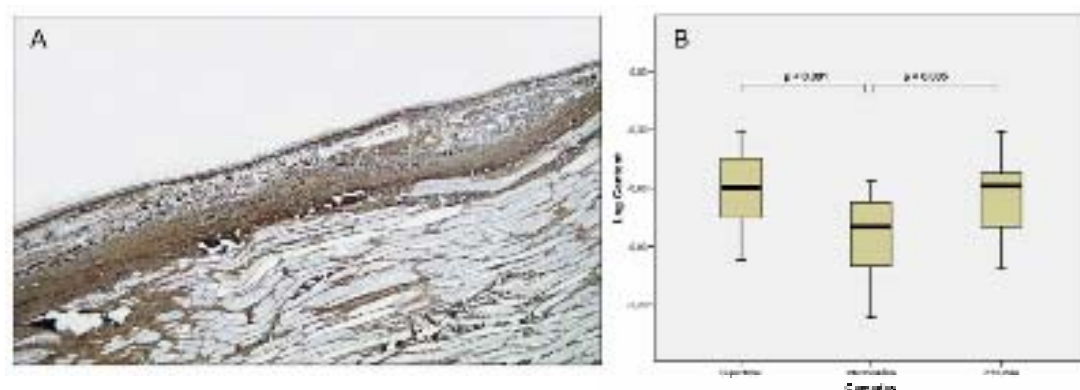


Figura 17. Expressão do colágeno tipo I num corte histológico coronal da região média da porção membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunohistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de colágeno tipo I na camada intermediária quando comparada à superficial e profunda (B).

O colágeno tipo III apresenta distribuição mais homogênea nas camadas da lâmina própria, com uma densidade estatisticamente menor na camada intermediária (I) quando comparada à camada profunda (P) ($p=0.001$), mas sem diferença estatística na camada superficial (S) (Figura 18).

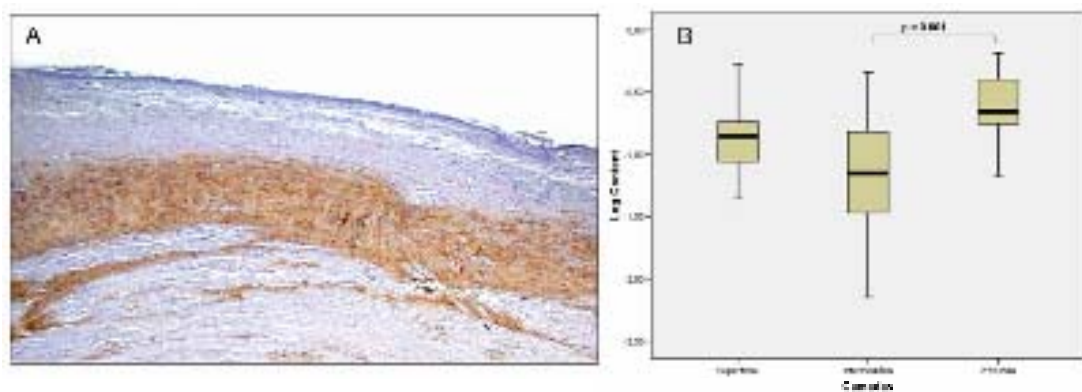


Figure 18. Expressão do colágeno tipo III num corte histológico coronal da porção média da região membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunoistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de colágeno tipo III na camada intermediária quando comparada à profunda (B).

O versican apresenta uma menor densidade de na camada superficial (S) quando comparada à camada intermediária (I) ($p=0.036$) e camada profunda (P) ($p=0.013$) (Figura 19).

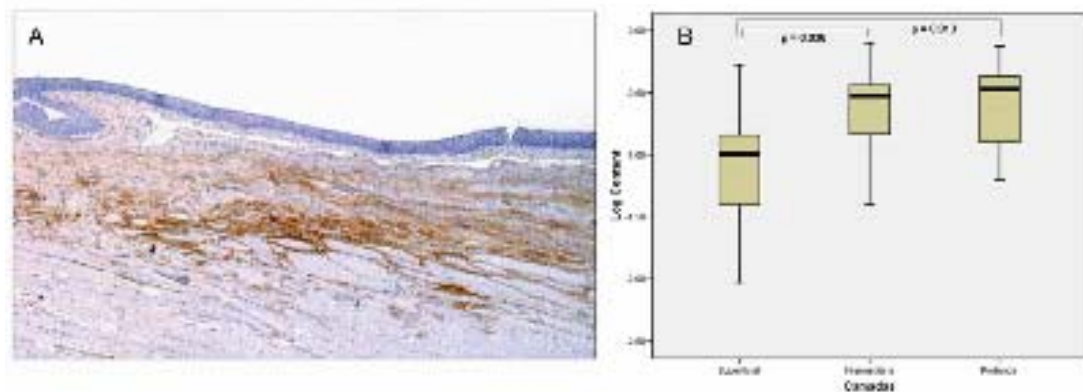


Figura 19. Expressão do versican num corte histológico coronal da porção média da região membranosa da lâmina própria da prega vocal por método imunistoquímico (A). (aumento de 50x) Gráfico de distribuição em camadas (linha horizontal dentro dos retângulos representando a mediana); densidade menor de versican na camada superficial quando comparada à intermediária e profunda (B).

Quando todas as camadas são consideradas conjuntamente há uma correlação positiva entre a densidade de versican e colágeno tipo III ($r = 0.57$, $p=0.010$) (Figura 20).

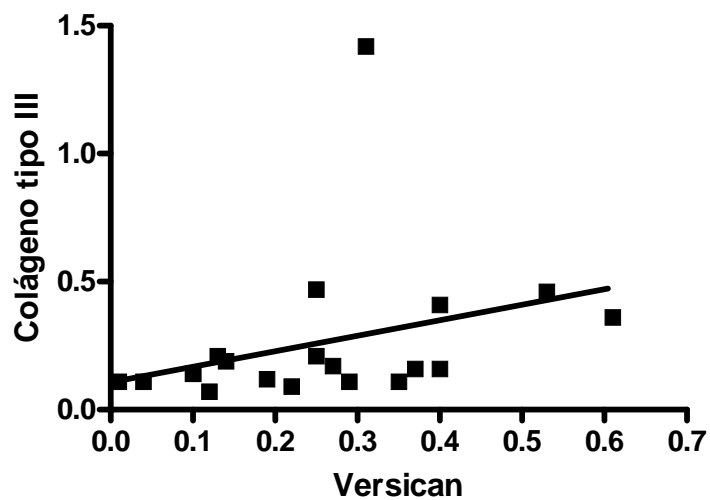


Figura 20. Gráfico mostrando a correlação positiva entre a densidade de versican e densidade de colágeno tipo III ($r = 0.57$, $p=0.010$) na lâmina própria da prega vocal em adultos.

A análise morfométrica categorizada por sexo revela que, a densidade de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican difere significativamente entre as camadas da lâmina própria.

No sexo feminino há menor densidade de colágeno tipo I na camada intermediária (I) quando comparada à camada superficial (S) ($p=0.02$) e camada profunda (P) ($P=0.28$ [0.10-0.51], $p=0.02$). No sexo masculino não foi observada diferença significativa entre as camadas (Figura 21).

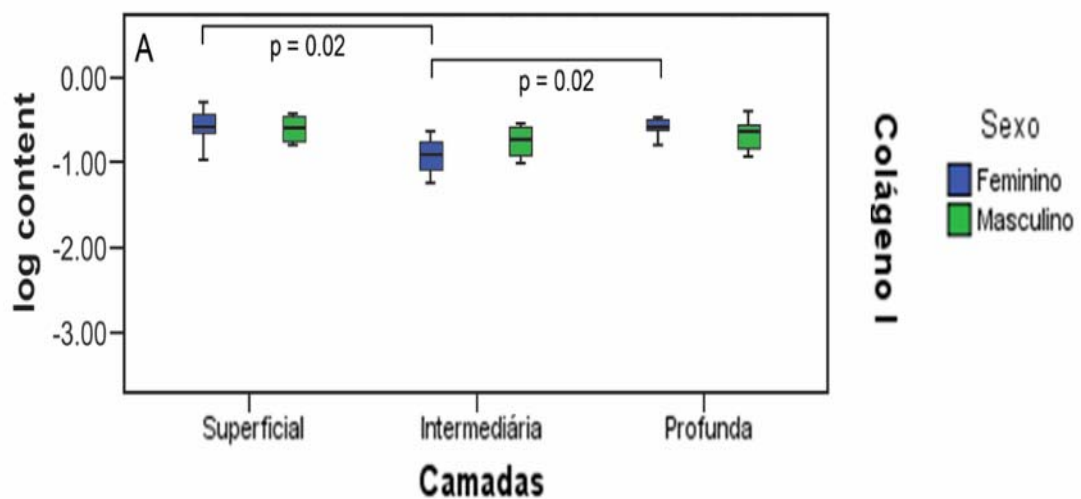


Figura 21. Distribuição do colágeno tipo I na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. Mulheres apresentam menor densidade na camada intermediária quando comparado à superficial e profunda.

Não há diferença na distribuição do colágeno tipo III no grupo feminino entre as camadas. Por outro lado, há uma maior densidade de colágeno tipo III na camada profunda (P) quando comparado à camada superficial (S) ($p=0.037$) e camada intermediária (I) ($p=0.018$) no grupo masculino (Figura 22).

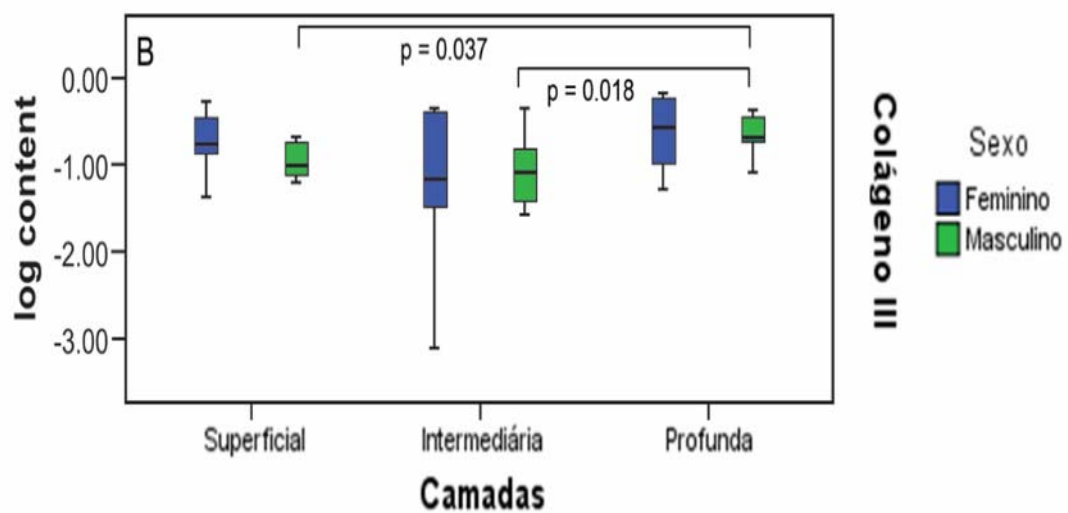


Figura 22. Distribuição do colágeno tipo III na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. Não há diferença na distribuição entre camadas nas mulheres; os homens apresentam maior densidade de colágeno tipo III na camada profunda quando comparada à superficial e intermediária.

Há menor densidade de versican em mulheres na camada superficial (S) quando comparado à camada intermediária (I) ($p=0.031$) e camada profunda (P) ($p=0.021$). Não há diferença estatística na densidade de versican entre as camadas no grupo masculino (Figura 23).

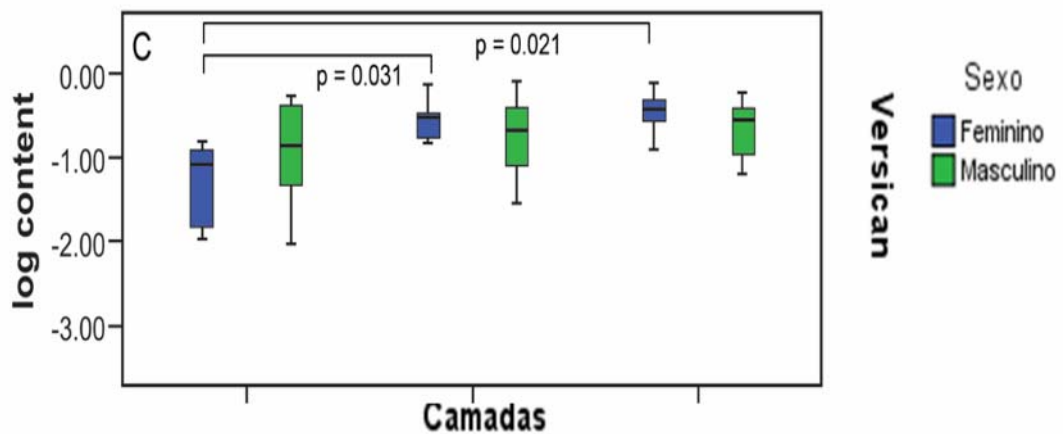


Figura 23. Distribuição do versican na lâmina própria da prega vocal. A linha horizontal nos retângulos representa a mediana. As mulheres apresentam menor densidade na camada superficial quando comparado à intermediária e profunda. Não há diferença na distribuição entre as camadas nos homens.

Não foi observada diferença entre a densidade total de colágeno tipo I e colágeno tipo III na lâmina própria da prega vocal de homens e mulheres. Há, no entanto, uma maior densidade de versican na lâmina própria de mulheres quando comparado aos homens. Esta diferença é notada na camada superficial (S) ($p=0.049$) (Figura 24).

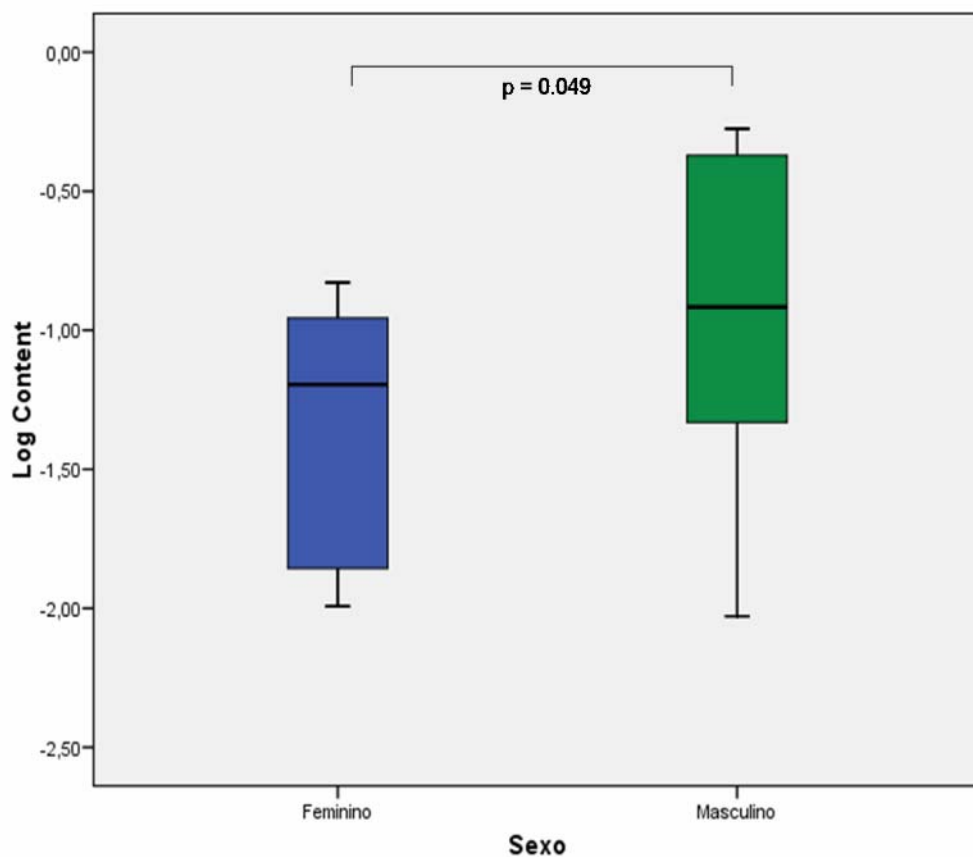


Figura 24. Distribuição do versican na lâmina própria da prega vocal com maior densidade na camada superficial de mulheres quando comparado aos homens ($p=0.049$). A linha horizontal nos retângulos representa a mediana.

Os valores das densidades médias de colágeno e versican nas camadas superficial, intermediária e profunda da lâmina própria das laringes fetais estudadas são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Densidade média de colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican nas camadas da lâmina própria da prega vocal de laringes adultas. S: camada superficial; I: camada intermediária; P: camada profunda

Caso		Colágeno tipo I			Colágeno tipo III			Versican		
Sexo	Idade	S	I	P	S	I	P	S	I	P
F	61	0.38	0.13	0.27	0.16	0.25	0.36	0.08	0.28	0.26
F	74	0.23	0.16	0.31	0.15	0.09	0.10	0.08	0.35	0.44
F	85	0.33	0.06	0.33	4.07	0.04	0.14	0.10	0.33	0.51
F	78	0.19	0.06	0.30	0.05	0.01	0.30	0.01	0.17	0.40
F	67	0.11	0.10	0.10	0.11	0.03	0.47	0.02	0.23	0.13
F	80	0.28	0.16	0.17	0.36	0.42	0.59	0.12	0.70	0.75
F	66	0.50	0.16	0.51	0.19	0.01	0.07	0.06	0.16	0.43
F	61	0.21	0.23	0.28	0.01	0.21	0.43	0.02	0.05	0.12
F	79	0.28	0.21	0.28	0.38	0.41	0.62	0.14	0.32	0.28
F	50	0.23	0.22	0.25	0.18	0.07	0.26	0.15	0.34	0.33
M	51	0.25	0.17	0.24	0.02	0.16	0.39	0.05	0.08	0.29
M	59	1.70	0.13	0.14	0.07	0.06	0.19	0.27	0.39	0.40
M	73	0.22	0.18	0.21	0.17	0.29	0.39	0.26	0.60	0.43
M	71	0.16	0.27	0.29	0.19	0.03	0.19	0.14	0.04	0.14
M	69	0.28	0.23	0.27	0.08	0.04	0.09	0.14	0.15	0.07
M	73	0.22	0.18	0.21	0.17	0.29	0.39	0.26	0.60	0.43
M	70	0.17	0.27	0.38	0.18	0.04	0.21	0.04	0.16	0.10
M	57	0.18	0.25	0.35	0.08	0.06	0.19	0.01	0.03	0.08
M	66	0.38	0.11	0.13	0.10	0.13	0.24	0.53	0.32	0.35
M	67	0.34	0.10	0.12	0.10	0.16	0.21	0.43	0.29	0.40

Não há correlação entre a densidade do colágeno tipo I, colágeno tipo III e versican na lâmina própria e a idade dos pacientes, tanto nos homens quanto nas mulheres.

A Figura 25 mostra uma representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual das fibras colágenas (tipo I e tipo III) entremeadas pelo proteoglicano versican na lâmina própria da prega vocal de adultos.

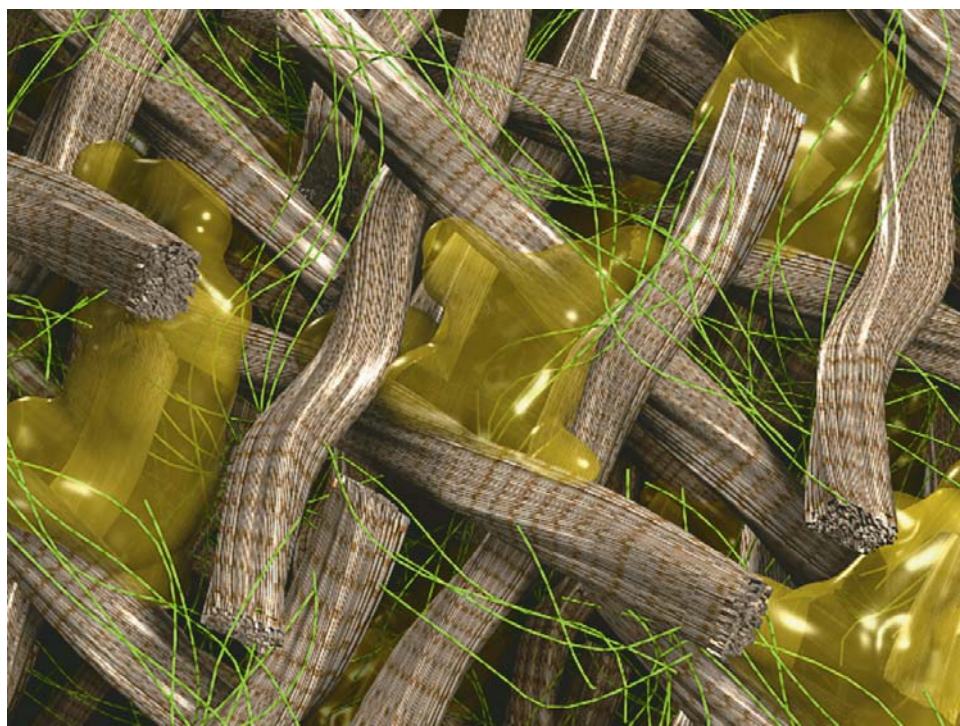


Figura 25. Representação gráfica tridimensional da arquitetura tecidual da fibra colágena tipo I (coloração marrom), fibra colágena tipo III (coloração verde) e proteoglicano versican (coloração amarelada) na lâmina própria da prega vocal de adultos.

5. DISCUSSÃO

5.1 GRUPO FETAL

Neste grupo é descrita a distribuição das fibras colágenas e do versican na lâmina própria de fetos entre 28 e 36 semanas de idade gestacional. Os dados mostram que há uma distribuição uniforme das fibras colágenas em toda a espessura da lâmina própria enquanto a densidade do versican é maior na camada superficial e na camada intermediária. Pesquisando na literatura, não encontramos nenhum estudo que avaliasse a expressão do proteoglicano versican na lâmina própria de pregas vocais de fetos humanos, como realizado neste estudo.

Poucos estudos descrevem os aspectos histológicos das pregas vocais fetais. Sabe-se que alterações progressivas na composição da lâmina própria ocorrem durante o desenvolvimento fetal. Na décima terceira semana de idade gestacional a lâmina própria consiste basicamente de células mesenquimais em suas três camadas laminares (Kurita et al., 1980; Subotic et al., 1984). A partir de 16 semanas começam a aparecer fibras finas com distribuição paralela à borda livre juntamente com as células mesenquimais. Com 23 semanas as fibras colágenas apresentam-se distribuídas numa camada única em toda a espessura da prega vocal (Subotic et al., 1984).

Estudos anteriores mostram que ao nascimento nota-se a presença de fibras colágenas na lâmina própria e que estas se distribuem em camada única (Ishii et al., 2000; Sato et al., 2005; Hartnick et al., 2005) semelhantes aos nossos achados, embora em população pós-nascimento.

A distribuição das fibras colágenas em fetos difere dos achados na população adulta. Melo et al. (2003) descrevem o arranjo em “cesta de vime” na distribuição do colágeno em adultos e sugerem que esta configuração possa ter importantes implicações na produção vocal. Este estudo mostra a viabilidade da utilização do método da Picrosirius polarização na visualização das fibras colágenas como descrito por Junqueira et al. (1979).

Não há dados disponíveis mostrando se esta configuração do colágeno já esta presente nos fetos ou se fará parte de um processo de maturação da matriz extracelular originário do estímulo vibratório durante a fonação e que ocorrerá somente após o nascimento.

Nosso estudo mostra a viabilidade do método da Picrosirius polarização na visualização das fibras colágenas em fetos de 28 a 36 semanas de idade gestacional. Estas fibras apresentam-se entrelaçadas em uma delicada trama semelhante a uma “cesta de vime” permitindo um deslizamento adequado como uma malha que se abre (Melo et al., 2003). Ainda que outros importantes componentes da matriz extracelular da prega vocal não tenham sido examinados, estes achados sugerem que mesmo não havendo uma demanda ao uso da estrutura vocal na vida intra-uterina, este órgão estaria preparado para a fonação logo após o nascimento.

Neste estudo também foi pesquisado um proteoglicano, que é considerado um componente ativo da matriz extracelular e desempenha importante função na fisiologia dos tecidos onde esta presente. O versican é um proteoglicano *condroitin* sulfato e sua presença em pregas vocais de adultos foi previamente descrito por Pawlak et al. (1996). Nenhum relato da presença do versican na lâmina própria da prega vocal na população fetal foi realizado. Os proteoglicanos,

incluindo-se o versican, foram estudados em tecidos pulmonares fetais embebidos em parafina com maior expressão nas idades gestacionais mais avançadas (Wright et al., 1999).

Os dados do nosso estudo mostram que o versican está difusamente presente na matriz extracelular da lâmina própria com maior densidade nas camadas superficial e intermediária quando comparado à camada profunda. Também observamos um reforço da expressão do versican na região subepitelial. Interessante é que uma distribuição similar do versican na porção superior da derme foi descrita por Sorrel et al. (1999) numa população de fetos em idade similar aos fetos deste estudo. Na prega vocal de adultos também é descrita uma expressão mais intensa na porção superior da camada intermediária da lâmina própria (Hahn et al., 2005).

O papel do versican na prega vocal fetal ainda não está claro. O versican possui a capacidade de unir-se ao ácido hialurônico formando estruturas com importância na viscosidade, osmose e resistência tecidual (Hardingham et al., 1992; Iozzo, 1998). Além disso, estas estruturas interagem com a fibronectina, colágeno tipo I e redes de fibras elásticas. A maior densidade do versican nas camadas superficial e intermediária da lâmina própria pode ser importante em determinar a deposição e distribuição do colágeno na prega vocal em desenvolvimento, uma vez que os proteoglicanos possuem importante papel na regulação da fibrilogênese do colágeno (Iozzo, 1998). A presença de grande quantidade de versican nas camadas superficial e intermediária pode contribuir para a formação do arranjo em “cesta de vime” durante o desenvolvimento das fibras colágenas nesta região, moldando a deposição das fibras e impedindo desta forma a sua agregação. A maior deposição do versican nesta região promove um aumento da distância entre as fibras de colágeno,

conferindo um aspecto de trama bem aberta, típica desta região, que necessita de maleabilidade para exercer sua função fonatória.

Mesmo não havendo uma diferença estatística significativa na densidade do versican entre a camada superficial e a camada intermediária nota-se um predomínio na distribuição do versican na região subepitelial da camada superficial o que pode estar relacionado a um reforço na proteção desta região devido ao maior impacto desta área durante a vocalização.

Por outro lado, uma menor quantidade de versican na camada profunda da lâmina própria pode promover uma estrutura com arranjo mais denso de colágeno, adequado para a função fisiológica de transmissão de tensão do músculo vocal para o restante da lâmina própria durante a modulação vocal. Além disso, o predomínio de versican nas camadas superficial e intermediária pode ser importante para a absorção de impacto durante a vocalização.

Os resultados sugerem também que, apesar de ainda não haver uma demanda pela utilização da estrutura vocal, a mesma já está preparada para o início de uma situação de uso intenso que se dará nos primeiros meses de vida com uma vocalização através do choro.

5.2 GRUPO ADULTO

Neste grupo é analisada a distribuição do colágeno tipo I, do colágeno tipo III e do versican na lâmina própria da prega vocal de adultos de ambos os sexos. As idades de homens e mulheres são pareadas. Os dados mostram que o colágeno tipo I, colágeno tipo III e o versican apresentam diferenças significativas em sua distribuição na lâmina própria estando relacionadas ao sexo.

A distribuição do colágeno total em pregas vocais humanas (como detectada com a coloração de Sirius Red), é descrita como sendo similar em todas as faixas etárias, mas com variadas densidades de acordo com o sexo e a idade (Melo et al., 2003). Em pregas vocais de adultos normais, a maioria do colágeno está presente na porção superficial imediatamente abaixo do epitélio tanto quanto nas porções mais profundas adjacentes ao músculo vocal (Hammond et al., 2000; Melo et al., 2003). Nota-se uma maior densidade em homens adultos e idosos (Hammond et al., 2000). Nosso estudo confirma o padrão de distribuição do colágeno tipo I, com predomínio na camada superficial e camada profunda. Quando os grupos são separados por sexo os dados mostram que as diferenças (entre as camadas) são mais acentuadas dentro do grupo feminino, mas não há diferença entre os sexos.

A análise do colágeno tipo III também revela diferenças na distribuição dentro da lâmina própria, com uma maior densidade na camada profunda quando comparada à camada superficial e camada intermediária. Os dados mostram que essas diferenças são mais acentuadas dentro do grupo masculino, mas novamente não há diferença significativa quando se comparam os sexos. Sabendo-se que o colágeno tipo III tende a ser mais concentrado em regiões dinâmicas dos tecidos com

propriedades elásticas, as diferenças na distribuição dos colágenos tipo I e tipo III podem potencialmente, estarem relacionadas ao estresse sofrido nas diferentes regiões desta lâmina própria (Culav et al., 1999). Como sugerido por Tateya et al. (2006), o colágeno tipo I providencia a tensão elástica necessária ao redor da membrana basal e do ligamento vocal para manter o corpo da prega vocal durante a vibração, enquanto a distribuição mais homogênea de colágeno tipo III pode ser importante para a manutenção da elasticidade tecidual.

Sendo o versican um proteoglicano de agregação grande, une-se ao ácido hialurônico (Iozzo, 1998) e frequentemente interage com o sistema de fibras elásticas (Kielty et al., 2002). O complexo ácido hialurônico-versican é altamente hidratado e apresenta papel significativo na inibição da interação célula-matriz, afetando o turgor e dissipando o impacto e forças de compressão na lâmina própria da prega vocal (Laurent et al., 1992). A presença do versican na prega vocal foi previamente descrita (Pawlak et al., 1996; Hahn et al., 2005; Skandalis et al., 2006), mas sem nenhum estudo avaliando sua distribuição dentro das camadas da lâmina própria. Nossos dados mostram que a densidade de versican é maior na camada intermediária e na camada profunda, sendo esta diferença mais acentuada nas mulheres. Uma densidade maior de versican é notada na camada superficial dos homens. Estes achados estão em desacordo com Hahn et al. (2005), que não acharam diferenças na distribuição do versican entre homens e mulheres. Entretanto, estes autores examinaram uma população menor (5 pacientes) que a deste estudo e utilizou uma análise semi-quantitativa para avaliação dos dados.

Os dados prévios e atuais mostram que a distribuição de versican dentro da lâmina própria humana varia de acordo com a idade. No grupo fetal que compõe este estudo percebemos que a densidade de versican é maior na camada superficial

(Bühler et al., 2008). Por outro lado, a densidade de versican foi menor na camada superficial em adultos quando comparado com as outras camadas. A razão para estas diferenças não está clara. É sabido que na presença de alguns proteoglicanos a síntese de colágeno resulta em fibrilas mais finas. Esta teoria poderia explicar a alta densidade de colágeno tipo I (fibrila densa) e a menor densidade de versican na camada superficial em adultos. Além disso, está em acordo com os dados deste estudo onde demonstramos uma correlação positiva entre o colágeno tipo III (fibrilas finas) e a densidade de versican.

A compreensão das diferenças relacionadas ao sexo na distribuição dos componentes da matriz extracelular da lâmina própria da prega vocal pode auxiliar no entendimento da grande vulnerabilidade da mulher nos processos cicatriciais da lâmina própria e também em algumas lesões benignas (Hahn et al., 2006). Embora nos homens adultos possa haver uma concentração total maior de colágenos na lâmina própria, os dados deste estudo e os dados obtidos por Hahn et al. (2006), mostram que a distribuição do colágeno tipo I e tipo III são similares entre os sexos. Por outro lado, a densidade de versican foi maior na camada superficial dos homens. Este dado poderia explicar a grande predisposição nas mulheres ou, a não disposição dos homens, para a ocorrência de lesões benignas laríngeas como o nódulo vocal. O versican pode apresentar uma importante função na absorção do impacto entre as pregas vocais durante a fonação. Com uma menor densidade de versican na camada superficial é provável que a prega vocal esteja mais propensa a traumas mecânicos.

Uma correlação entre idade e expressão de colágeno foi estudada por Hammond et al. (2000), com maior expressão do colágeno em indivíduos idosos. Em nosso estudo não pudemos achar esta correlação pelo fato do grupo ser composto por população adulta com um intervalo limitado de idades.

5.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O universo da pesquisa na investigação dos componentes da matriz extracelular da prega vocal humana é extremamente amplo despertando o interesse e a curiosidade dos envolvidos. Os resultados do grupo fetal mostram uma estrutura laríngea preparada para a vocalização ao nascimento com uma distribuição compatível dos componentes da matriz extracelular. No grupo adulto percebemos uma mudança desta distribuição entre as camadas podendo estar relacionada ao sexo como no caso do versican. Tais mudanças podem ocorrer por influência de fatores pessoais, relacionados ou não ao sexo, e a fatores externos dos mais diversos. O estudo desenvolvido representa apenas uma parcela dos questionamentos existentes para a compreensão destas mudanças. Um próximo passo seria a avaliação da expressão dos colágenos através de imunoistoquímica na população fetal permitindo após, uma comparação com o grupo adulto e também, estudos futuros com grupos de intervalos etários mais amplos e submetidos a fatores externos específicos poderiam auxiliar na busca de novas respostas.

6. CONCLUSÕES

6.1 GRUPO FETAL

1. As fibras colágenas estão presentes na lâmina própria da prega vocal e apresentam distribuição uniforme formando uma camada monolaminar em toda a sua espessura. A distribuição espacial das fibras colágenas dá-se num arranjo denominado em “cesta de vime”.
2. O método imunoistoquímico mostra-se viável na identificação do proteoglicano versican na lâmina própria da prega vocal fetal com densidade maior nas camadas superficial e intermediária da lâmina própria quando comparado à camada profunda.

6.2 GRUPO ADULTO

1. O colágeno tipo I apresenta menor densidade na camada intermediária quando comparado à camada superficial e profunda da lâmina própria. O colágeno tipo III apresenta densidade menor na camada intermediária quando comparada à camada profunda, sem diferença estatística na camada superficial. O versican apresenta densidade menor na camada superficial quando comparado à camada intermediária e camada profunda. Há correlação positiva entre a densidade de versican e colágeno tipo III na lâmina própria da prega vocal.

8. REFERÊNCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M. *The extracellular matrix of animals*. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York (NY): Garland Science; 2002. p.971-84.

Bühler RB, Sennes LU, Mauad T, Melo ECM, Silva LFF, Saldiva PHN. Collagen fiber and versican distribution within the lamina propria of fetal vocal folds. *Laryngoscope*. 2008;113:2187-2191.

Butler JE, Hammond TH, Gray SD. Gender related differences of hialuronic acid in the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2001;111:907-11.

Campos Bañales ME, Perez Piñero B, Rivero J, Ruiz Casal E, López Aguado D. Histological structure of the vocal fold in the human larynx. *Acta Otolaryngol*. 1995;115:701-4.

Catten M, Hammond TH, Zhou R, Hammond EH, Gray SD. An analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998;118:663-7.

Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999;79:308-19.

Gray SD. Basement membrane zone injury in vocal nodules. In: Gauffin J, Hammarberg B, editors. *Vocal fold physiology*. San Diego: Singular Publishing Group; 1991. p.21-7.

Gray SD, Hirano M, Sato K. Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. In: Titze IR. *Vocal Fold physiology: frontiers of basic science*. San Diego: Singular Publishing Group; 1993. p.1-34

Gray SD, Titze IR, Chan R, Hammond T. Vocal fold proteoglycan and their influence on biomechanics. *Laryngoscope*. 1999;109:845-54.

Gray SD, Chan KJ, Turner B. Dissection plane of the human vocal fold lamina propria and elastic fiber concentration. *Acta Otolaryngol*. 2000;120:87-91.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Midmembranous vocal fold lamina propria proteoglycans across selected species. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:451-62.

Hahn MS, Kobler JB, Starcher BC, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix I: elastic fibers and hyaluronic acid. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006a;115:156-64.

Hahn MS, Kobler JB, Zeitels SM, Langer R. Quantitative and comparative studies of the vocal fold extracellular matrix II: collagen. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006b;115:225-32.

Hammond T, Gray S, Butler J. Age and gender related collagen distribution in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:913-20.

Hammond T H, Zhou R Hammond E H, Pawlak A, Gray S D. The intermediate layer: a morphological study of the elastin and hyaluronic acid constituents of normal human vocal folds. *J Voice*. 1997;11:59-66.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992;12:137-47.

Hartnick C J, Rehbar R, Prasad V. Development and maturation of the pediatric human vocal fold lamina propria. *Laryngoscope*. 2005;115:4-15.

Hirano M. Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr.* (Basel) 1974;26:89-94.

Hirano M. Phonosurgery: basic and clinical investigation. *Otologia.* (Fukuoka) 1975;1(21):239-442.

Hirano M. Structure of the vocal fold in normal and disease states: an anatomical and physical studies. *ASHA Reports.* 1981;11:11-30.

Hirano M, Kurita S, Nakashima T. Growth, development and aging of human vocal folds. In: Bless DM, Abbs JH, editors. *Vocal fold physiology.* San Diego: College Hill Press, 1983. p.22-43.

Hirano M, Kakita Y. Cover-body theory of vocal fold vibration. In: Daniloff RG, editor. *Speech science: recent advances.* San Diego: College-Hill Press; 1985. p.1-46.

Hirano M, Sato K, Nakashima T. Fibroblasts in human vocal fold mucosa. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 1999;119:271-6.

Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Resp Crit Care Med.* 1999;160:725-9.

Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:609-52.

Ishii K, Zhai WG, Akita M, Hirose H. Ultrastructure of the lamina propria of the human vocal fold. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 1996;116:778-82.

Ishii K, Yamashita K, Akita M, Hirose H. Age-related development of the arrangement of connective tissue fibers in the lamina propria of the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109:1055-64.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibers. *J Cell Sci*. 2002;115:2817-28.

Kuritas S. Layer structure of the human vocal fold: morphological investigation. *Otologia*. (Fukuoka) 1980;26:973-97.

Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Lett* 1990;268:386-93.

Lander AD. Proteoglycans. In: Kreis T, Vale R, editors. Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins. New York (NY): Oxford University Press; 1993. p.12-6.

Laurent T C, Fraser JRE. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992;6:2397-404.

McCarthy KJ, Accavitti MA, Couchmann JR. Immunological characterization of a basement membrane-specific chondroitin sulfate proteoglycan. *J Cell Biol*. 1989;109:3187-98.

Melo ECM, Lemos M, Ximenes Filho JA, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH. Distribution of collagen in the lamina propria of the human vocal fold. *Laryngoscope*. 2003;113:2187-91.

Milutnovic Z, Polic D, Milenkovic A, Sretenovic V. Spatial arrangement of the structural elements of vocal fold layers: an adjustment to the vibration process. *J Voice*. 1998;12:17-20.

Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens modifying enzymes and their mutation in humans, flies and worms. *Trends Genet*. 2004;20:33-43.

Miserocchi G, Negrini D, Passi A, De Luca G. Development of lung edema: interstitial fluid dynamics and molecular structure. *News Physiol Sci*. 2001;16:66-71.

Montes GS. Structural biology of the fibers of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int*. 1996;20:15-27.

Nietfeld JJ. Cytokines and proteoglycans. *Experientia*. 1993;49:456-69.

Paulsen F, Kimpel M, Lockemann U, Tillmann B. Effects of ageing on the insertion zones of the human vocal fold. *J Anat*. 2000;196:41-54.

Pawlak AS, Hammond E, Hammond T, Gray SD. Immunohistochemical study of proteoglycans in vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105:6-11.

Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:229-55.

Saika S, Shiraishi A, Liu CY, Kawashima Y, Kao WW. Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing. *J Biol Chem*. 2000;275:2607-12.

Sato K, Hirano M. Histologic investigation of the macula flava of the human newborn vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:556-62.

Sato K, Hirano M. Fine three dimensional structure of pericytes in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997;106:490-4.

Sato K. Reticular fibers in the vocal fold mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1998;107:1023-8.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Stellate cells in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:319-25.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Fine structure of the human newborn and infant vocal fold mucosae. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001;110:417-24.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. Age-related changes of collagenous. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002;111:15–20.

Sato K, Hirano M, Nakashima T. 3D structure of the macula flava in the human vocal fold. *Acta Otolaryngol*. 2003;123:269-73.

Sato K, Nakashima T. Vitamin A storing stellate cells in the human newborn vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2005;114:517–24.

Skandalis SS, Theocaris AD, Theocaris DA, Papadas T, Vynios DH, Papageorgakopoulou N. Matrix proteoglycans are markedly affected in advanced laryngeal squamous cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. 2004a;1689:152-61.

Skandalis SS, Theocaris AD, Theocaris DA, Papadas T, Vynios DH, Papageorgakopoulou N. Proteoglycans in human laryngeal cartilage. Identification of proteoglycan types in successive cartilage extracts with particular reference to aggregating proteoglycans. *Biochimie*. 2004b;86:221-9.

Sorrell JM, Carrino DA, Baber MA, Caplan AI. Versican in human fetal skin development. *Anat Embryol*. 1999;199:45-56.

Subotic R, Vecerina S, Krajina Z, Hirano M, Kurita S. Histological structure of vocal fold lamina propria in foetal larynx. *Acta Otolaryngol*. (Stockh) 1984;97:403-6

Tateya T, Tateya I, Bless DM. Collagen subtypes in human vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115:469-76.

Tateya T; Tateya I; Bless DM. Immuno-Scanning electron microscopy of collagen types I and III in human vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2007;116:156-9.

Vecerina –Volic S, Hirano H, Karovic-Krzelj V. Macula flava in the vocal fold of human fetus. *Acta Otolaryngol.* (Stockh) 1988;105:144-148.

Ximenes Filho JA, Tsuji DH, Nascimento PH, Sennes LU. Histologic changes in human vocal folds correlated with aging: a histomorphometric study. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112:894-8.

Wiberg C, Heinegard D, Wenglen C, Timpl R, Morgelin M. Biglycan organizes collagen VI into hexagonal-like networks resembling tissue structures. *J Biol Chem.* 2002;277:49120-6.

Wright C, Strauss S, Toole K, Burt AD, Robson SC. Composition of the pulmonary interstitium during normal development of the human fetus. *Pediatric Dev Pathol.* 1999;2:424-31.

Zhang Y, Cao L, Yang BL, Yang BB. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem.* 1998;273:21342-51.

Zimmerman DR. Versican. In: Kreis T, Vale R, editor. *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins.* New York (NY): Oxford University Press; 1993. p.100-1.

APÊNDICE



DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 29.04.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **279/04**, intitulado: "Padrão de distribuição do colágeno na lâmina própria da prega vocal humana relacionado com a idade" apresentado pelo Departamento de OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Luiz Ubirajara Sennes

Pesquisador(a) Executante: Dr. Rogerio Borghi Bühler

CAPPesq, 29 de Abril de 2004.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Euclides Ayres de Castilho'.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")